

プロスタグランジン細胞外放出トランスポーターを 標的とする新規治療戦略の基盤構築に関する研究

著者	田中 伸明
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18629号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00125888

博士論文

プロスタグランジン細胞外放出トランスポーターを標的とする
新規治療戦略の基盤構築に関する研究

平成 30 年度

東北大学大学院薬学研究科

医療薬学専攻

病態分子薬学分野

田中 伸明

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Nobuaki Tanaka, Hiroaki Yamaguchi, Ayako Furugen, Jiro Ogura, Masaki Kobayashi, Takehiro Yamada, Nariyasu Mano, and Ken Iseki.

Quantification of intracellular and extracellular eicosapentaenoic acid-derived 3-series prostanoids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry.

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. (2014) **91**, 61-71.

2. Nobuaki Tanaka, Hiroaki Yamaguchi, and Nariyasu Mano.

Transport of Eicosapentaenoic Acid-Derived PGE₃, PGF_{3α}, and TXB₃ by ABCC4.

PLOS ONE. (2014) **9**, e109270.

3. Nobuaki Tanaka, Junya Kawai, Noriyasu Hirasawa, Nariyasu Mano, and Hiroaki Yamaguchi.

ATP-Binding Cassette Transporter C4 is a Prostaglandin D₂ Exporter in Mast Cell Lines.

in submitting.

4. Nobuaki Tanaka, Hiroaki Yamaguchi, and Nariyasu Mano.

Involvement of H⁺-gradient dependent transporter in PGE₂ release from A549 cells.

in submitting.

略号表

AA	Arachidonic acid
ABC	ATP-binding cassette
AKR	Aldo-keto reductase
AMP	Adenosine monophosphate
APS	Ammonium persulfate
ATP	Adenosine triphosphate
BHT	Dibutylhydroxytoluene
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CE	Collision energy
CEP	Collision cell entrance potential
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	Cytosolic phospholipase A ₂
CXP	Collision cell exit potential
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DP	Declustering potential
E ₂ 17βG	Estradiol 17β-glucuronide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EP	Entrance potential
EPA	Eicosapentaenoic acid
ESI	Electrospray ionization
FBS	Fetal bovine serum

HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IC ₅₀	Half maximal (50%) inhibitory concentration
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MCT	Monocarboxylate transporter
Mfsd2b	Major facilitator superfamily transporter 2b
mRNA	Messenger RNA
NMDG	N-methyl-D-glucamine
OATP	Organic anion transporting polypeptide
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PG	Prostaglandin
PKA	Protein kinase A
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
SLC	Solute carrier
SPE	Solid-phase extraction
SPNS2	Spinster homolog 2
SRM	Select reaction monitoring
S1P	Sphingosine-1-phosphate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TX	Thromboxane

目次

序論.....	1
第1章 2-series PG と 3-series PG の細胞内外定量法の確立	7
第1節 序	7
第2節 MS 条件及び LC 条件の決定	8
第3節 回収率及びマトリックス効果	10
第4節 検量線及び日内・日間再現性	12
第5節 考察.....	15
第2章 ABCC4 阻害効果の細胞選択性及び ABCC4 阻害時の PG バランスの変化の解析	17
第1節 序	17
第2節 ABCC4 による PGD ₂ 、PGD ₃ 、PGE ₃ 、PGF _{3α} 輸送の特性解析.....	18
第3節 ABCC4 阻害効果の細胞選択性の解析.....	23
第4節 抗原刺激後の肥満細胞からの PGD ₂ 細胞外放出における ABCC4 の寄与の解析	31
第5節 ABCC4 を介した PG 輸送の基質選択性に関する検討	34
第6節 考察.....	42
第3章 新規 PGE ₂ 細胞外放出トランスポーターの探索	51
第1節 序	51
第2節 A549 細胞膜小胞を用いた PG 輸送の駆動力探索	54
第3節 A549 細胞からの PGE ₂ 放出における H ⁺ 勾配の関与	56
第4節 H ⁺ 勾配依存的 PGE ₂ 輸送の特性解析	58
第5節 考察.....	60
総括.....	65
謝辞.....	69

実験の部	71
引用文献	84

序論

プロスタグランジン (PG) は、アラキドン酸 (AA) をはじめとする炭素数 20 の多価不飽和脂肪酸から生合成される脂質メディエーターの一つである。細胞膜のリン脂質に結合した AA がホスホリパーゼ A2 によって遊離した後、シクロオキシゲナーゼ (COX) により PGH₂ へと変換される。PGH₂ は各種 PG 合成酵素により PGE₂、PGD₂、PGF_{2α}、PGI₂、トロンボキサン A₂ (TXA₂) となり、細胞外へ放出される。その後、産生細胞自身または近傍細胞に発現する G タンパク質共役型受容体に結合することで生理作用を発揮する (Fig. 1) ^{1,2}。各 PG はそれぞれ異なる受容体に結合することから、多様な生理作用 (免疫応答調節や腸管バリア機能の維持、血液凝固制御、睡眠覚醒制御など) を示す ³⁻⁸。

PG は炎症性疾患 (関節リウマチ・炎症性腸疾患) や心血管系疾患 (アテローム性動脈硬化、高血圧)、アレルギー性疾患 (アレルギー性鼻炎、気管支喘息)、アルツハイマー病、がんなど多様な疾患に関与することが知られており ^{4,9-15}、これらの疾患における治療標的とされている。COX ノックアウトマウスを用いた検討から、COX-1 は AA 誘発性炎症、COX-2 はカラゲニン誘発性炎症に関与することが報告されている ^{8,9}。炎症反応では PGE₂ や PGI₂ など複数の PG が関与することも知られているため ^{16,17}、COX の阻害薬である非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は複数の PG を同時に減少させることで抗炎症・鎮痛効果を示すと考えられている。受容体の選択的阻害やノックアウトによる表現型解析も既に行われており ⁷、例えば PGD₂ の受容体である Chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells (CRTH2) は、アレルギー性炎症が生じた部位への Th2 細胞の遊走や Th2 サイトカインの産生に関与することが明らかとなっている ^{11,12}。一方でアレルギー性炎症時には PGE₂ が EP3 を介してアレルギー反応を抑制することも知られている ¹²。このことから、PGD₂ と PGE₂ の両者を低下させる NSAIDs は有効でなく、CRTH2 選択的阻害薬がアレルギー性疾患に対する治療薬として使用されている ^{11,12,18,19}。さらに、近年は COX の下流に存在する各種 PG の合成酵素も標的とした創薬研究が進められている。PGE₂ 合成酵素である mPGES-1 をノ

ックアウトした場合、COX-2 の場合と異なり PGI₂ の生合成量が減少せず（PGI₂ 代謝物排泄量が野生型と比較し 60 %増加）、血圧や血栓形成に影響を及ぼさなかったと報告されている²⁰。また、mPGES-1 ノックアウトマウスでは中枢性感作が抑制されたことが報告され、mPGES-1 阻害薬は NSAIDs より安全性の高い鎮痛薬になると期待されている^{20, 21}。以上のことから、PG の合成や作用発現に関与するタンパク質を標的とすることで、疾患治療に有用な薬物の創生が期待されている。

PG は細胞内で生合成された後、近傍細胞膜上に発現する受容体に結合するために、細胞外へ放出されることが必須である。このことから、PG の細胞外放出過程も疾患治療のための標的となりうると考えられる。しかしながら、PG は比較的脂溶性の高い化合物であるため主に受動拡散で細胞外へ放出されると考えられ、細胞外放出の研究は進められていなかった。実際、PG の細胞膜透過性は多糖類であるイヌリンと同程度に低く^{22, 23}、また極性細胞からの放出において、頂端膜側と基底膜側への放出量が異なることから、細胞膜透過に何らかの分子メカニズムが関与すると考えられている^{24, 25}。1995 年に Kanai らによって PG の細胞内への取り込みに prostaglandin transporter (PGT/SLCO2A1) が寄与し²⁶、細胞内の代謝酵素と連動して PG の不活性化に関わることが明らかとされた (Fig. 1)^{27, 28}。PG と同様エイコサノイドに分類されるロイコトリエン C₄ (LTC₄) の細胞外放出には ATP-binding cassette transporter C1 (ABCC1) が寄与し、ABCC1 ノックアウトマウスで LTC₄ による動脈硬化や気管支炎が抑制されたことが報告されている^{29, 30}。以上の例から、PG の細胞外放出においてもトランスポーターが介在し、かつ PG の生理作用発現制御を果たしていると考えられ、創薬標的となりうると考えた。

細胞外放出を担うトランスポーターを標的とすることで期待されることとして、組織選択的な PG シグナル抑制を実現できる可能性がある。これにより、病巣部位での局所的な PG の生理作用を抑制する、あるいは PG の多様な作用の一部を選択的に制御することが可能になると期待される。その可能性を示す一例として、リン脂質メディエーターに分類される sphingosine-1-phosphate (S1P) の細胞外放出に寄与することが知られる、血管・リンパ管内

皮細胞に発現する spinster homolog 2 (SPNS2)³¹⁻³⁴と赤血球・血小板に発現する major facilitator superfamily transporter 2b (Mfsd2b)³⁵がある。SPNS2 ノックアウトマウスはリンパ液中の SIP 濃度低下による T 細胞のリンパ節からの放出抑制及びアポトーシスの亢進などを示し^{33,34}、SPNS2 は免疫系の制御に関わる。一方 Mfsd2b ノックアウトマウスではリンパ球への影響はほとんどないものの、赤血球数の減少が見られることが報告されている³⁵。同様に PGD₂ は脳内、末梢組織においてそれぞれ生理的な睡眠の誘発、アレルギー反応に関わることから、例えば末梢組織（肥満細胞等）での PGD₂ 放出を選択的に抑制することができれば、睡眠への影響を小さくした抗アレルギー薬の創生が実現可能になると期待される。

一方、細胞外放出を担うトランスポーターを標的とすることで、複数の PG の作用が同時に抑制され、副作用に繋がる可能性も否定できない。PG は互いに類似した化学構造を有するため、1 つのトランスポーターが複数の PG を輸送基質とする可能性が高く、例として PGT は 5 種の PG を輸送することが知られている²⁶。複数の PG の作用を同時に抑制できる薬剤として既に COX-2 選択的阻害薬が使用されているが、添付文書の警告にも記載されている血栓塞栓性副作用は、主に COX-2 から生合成される PGI₂ の産生量が低下し、主に COX-1 から生合成される TXA₂ とのバランスが崩れることにより生じると考えられている^{36,37}。このことから、複数の PG の細胞外放出を抑制しても、PG のバランス変化が小さい場合には副作用が発生する可能性は低いと考えられる。PG 細胞外放出トランスポーターを標的としても PG バランスに与える影響が小さいことがわかれば、長期的な投与時の安全性に優れた薬剤の創生に繋がり、慢性疾患の治療に応用できると期待される。

これまで、ATP-binding cassette transporter C4 (ABCC4) が PG の細胞外放出に関与するトランスポーターとして知られている。ABCC4 は PGE₂、PGF_{2α}、TXB₂ を輸送基質とすることが報告されており^{38,39}、Lin らは ABCC4 ノックアウトマウス由来線維芽細胞で PGE₂ 細胞外放出が減少したことを報告した⁴⁰。さらに、ABCC4 ノックアウトマウスでは痛覚閾値の上昇が報告されており⁴⁰、ABCC4 を抑制することで PGE₂ の作用が減弱する可能性が示された。また、我々はヒト肺腺癌由来 A549 細胞を用いて、PGE₂ に加え PGF_{2α} の細胞外放出に

も ABCC4 が寄与することを明らかにした⁴¹。

その一方で、前述のトランスポーターを標的とすることで期待される細胞選択的な効果については、ABCC4 を対象とした検証が行われていない。また、ABCC4 は複数の PG を輸送基質とするが、その阻害によって PG バランスに影響を及ぼすかどうかとも検証されていない。この 2 点を明らかにすることで、PG 細胞外放出トランスポーターとしての ABCC4 を標的とする治療戦略の有用性を評価することが可能と考えたため、本研究において検証に着手した (Fig. 2A, B)。

さらに本研究では、新規 PG 細胞外放出トランスポーターの探索にも着手した。これまで ABCC4 をノックアウトしたマウスや ABCC4 をノックダウンした培養細胞でも、PG 細胞外放出が完全には抑制されないことが明らかとなっている。しかしながら、ABCC4 の他に PG 細胞外放出を担うトランスポーターは報告されていない。新たな PG 細胞外放出トランスポーターを同定し、ABCC4 と同様に細胞選択性や PG 選択性を調べることで治療標的となりうるか評価できると考え、まず同定に向け新規 PG 細胞外放出トランスポーターの輸送特性を解析することとした (Fig. 2C)。

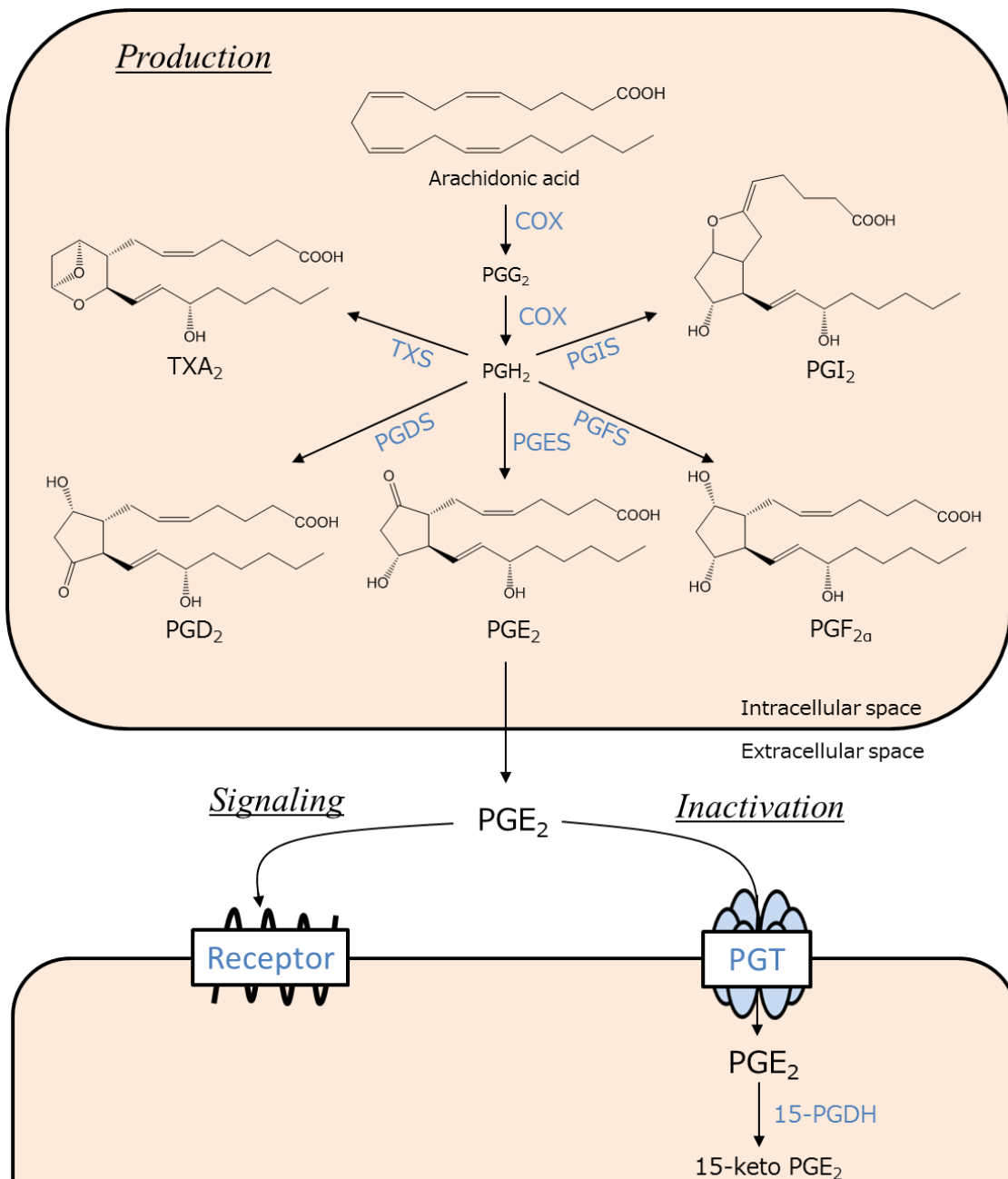
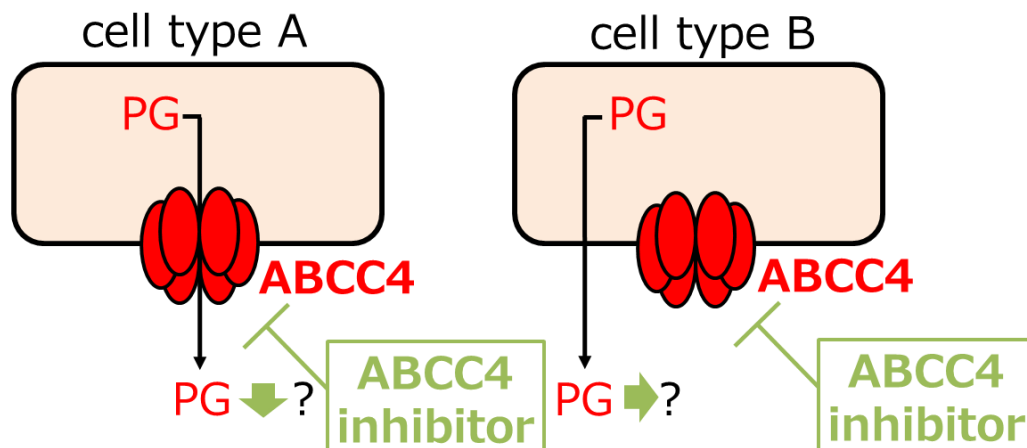


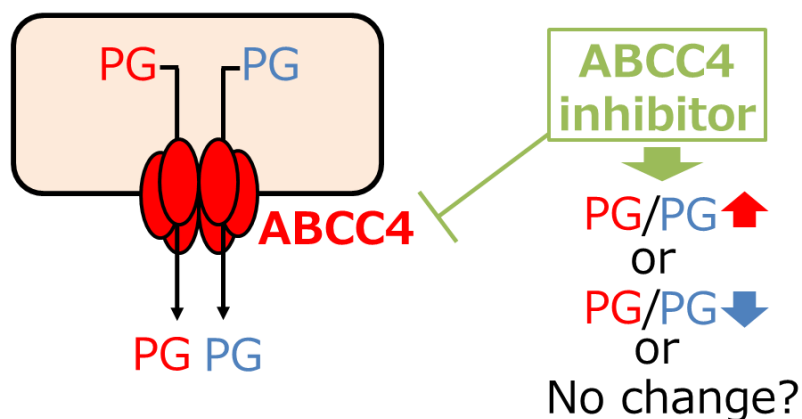
Fig. 1 Mechanisms of PG production, signaling, and inactivation.

COX : cyclooxygenase, PGES : prostaglandin E synthase, PGDS : prostaglandin D synthase, PGFS : prostaglandin F synthase, PGIS : prostaglandin I synthase, TXS : thromboxane synthase, PGT : prostaglandin transporter, 15-PGDH : 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase

(A) Cell selectivity of ABCC4 inhibitor



(B) Alteration of PG balance by ABCC4 inhibitor



(C) Other transporters

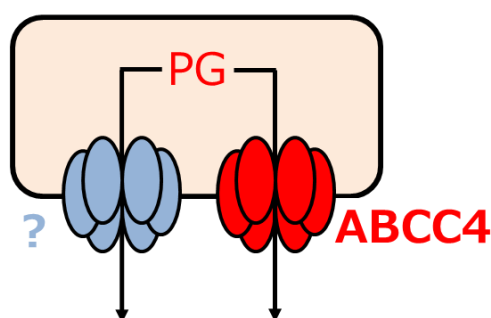


Fig. 2 The questions of PG release via membrane transporters.

- (A) What types of cells does ABCC4 function as a PG exporter in? To investigate this, several types of cell lines by which same PG was produced were used to elucidate the contribution of ABCC4 to the release of PG in each cell.
- (B) Would ABCC4 inhibitor alter the extracellular levels ratio of PGs? The information of kinetic parameters and intracellular concentration of PGs might be necessary to clarify this question.
- (C) What are other transporters which have a role to release PGs from cells? If the novel PG release transporters were identified, these might be therapeutic targets instead of ABCC4.

第1章 2-series PG と 3-series PG の細胞内外定量法の確立

第1節 序

細胞外放出トランスポーターの阻害によって PG バランスに変化が生じるか調べるために、本研究ではエイコサペンタエン酸 (EPA) から生合成される 3-series PG を対象にすることとした。3-series PG は AA から生合成される 2-series PG と同じ経路で生合成されるため⁴²、細胞に EPA を添加することで 2-series PG と共存させることが可能となる。また、3-series PG は受容体に対する親和性が 2-series PG と異なることが知られており⁴³、このことから ABCC4 による 3-series PG 輸送の速度論パラメーターは 2-series PG と異なる可能性が高く、選択性の評価に適すると考えられた。加えて、3-series PG は受容体に対する親和性や固有活性が 2-series PG と異なり、その一つである PGE₃ は PGE₂ に拮抗してサイトカイン産生や細胞増殖を抑制することが明らかとなっている⁴³⁻⁴⁶。ABCC4 阻害により 2-series PG と 3-series PG のバランス変化が生じれば、疾患の進行に影響を及ぼす可能性があることから、3-series PG も対象とする必要があると考えた。

トランスポーターを介した細胞外放出の基質選択性を評価するためには、Michaelis 定数 (K_m) や最大輸送速度 (V_{max}) などの輸送の速度論パラメーターを明らかにするだけでなく、細胞を用いた PG 放出実験において細胞内濃度を測定する必要もある。このことから、2-series PG と 3-series PG の細胞内外測定法の構築が必要であると考えた。これまで高速液体クロマトグラフィー-酵素結合免疫測定法⁴⁷ や液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS)⁴⁸ による 3-series PG 測定法が報告されているが、前者は測定に要するサンプル量が多く、また後者は細胞内量と細胞外量を分離して測定することができなかった。そこで、過去に構築された LC-MS/MS による 2-series PG の細胞内外測定法⁴⁹ を改変し、3-series PG も同時に測定する手法を構築することとした。

第2節 MS 条件及び LC 条件の決定

はじめに、3-series PG (PGE₃、PGD₃、PGF_{3α}、Δ¹⁷-6-keto PGF_{1α}、TXB₃) の標準品を用いて、ESI ネガティブイオンモードにおけるマススペクトルを確認したところ、いずれも脱プロトン化したと考えられる基準ピークが確認された。次に、それぞれの基準ピークをプレカーサーイオンに設定し、プロダクトイオンマススペクトル (Fig. 3) を確認後、その中で強度の高いプロダクトイオンをモニタリングイオンとして選択した。測定対象とする PG の SRM パラメーターを Table 1 に示した。PGE₃ と PGD₃ は同様のフラグメントパターンを示すことから、液体クロマトグラフィーによる分離条件を検討した。これまでの 2-series PG 測定法では、CAPCELL PAK C18 MG II (150 mm × 2.0 mm i.d. Shiseido) の粒子径 5 μm の分析カラムにより PGE₂ と PGD₂ の良好な分離を達成していた。しかしながら、既報では PGE₃ と PGD₃ の分離度は PGE₂ と PGD₂ より小さくなったことから⁴⁸、PGE₃ と PGD₃ を良好に分離するために粒子径 3 μm のカラムに変更した。その結果、アセトニトリル/水/酢酸 (40:60:0.1, v/v/v) を移動相として、PGE₃ と PGD₃ を良好に分離することができた (*R_s* = 1.92)。各 3-series PG の代表的な SRM クロマトグラムを Fig. 4 に示した。

Table 1 SRM parameters for detection of PGs.

PGs	SRM transition	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CEP (V)	CXP (V)
PGE ₃	<i>m/z</i> 349 → 269	-20	-4.0	-20	-15	-2
PGD ₃	<i>m/z</i> 349 → 269	-20	-4.0	-20	-15	-2
PGF _{3α}	<i>m/z</i> 351 → 307	-50	-4.5	-25	-15	-3
TXB ₃	<i>m/z</i> 367 → 169	-20	-4.0	-25	-15	-2
Δ ¹⁷ -6-keto-PGF _{1α}	<i>m/z</i> 367 → 163	-50	-4.5	-40	-25	-2
PGE ₂	<i>m/z</i> 351 → 271	-30	-4.5	-16	-18	-1
PGD ₂	<i>m/z</i> 351 → 271	-30	-4.5	-16	-18	-1
PGF _{2α}	<i>m/z</i> 353 → 193	-50	-4.5	-40	-18	-1
TXB ₂	<i>m/z</i> 369 → 169	-35	-4.5	-24	-28	-1
6-keto-PGF _{1α}	<i>m/z</i> 369 → 163	-40	-4.5	-38	-18	-1

DP: Declustering potential, EP: Entrance potential, CE: Collision energy, CEP: Collision cell entrance potential, CXP: Collision cell exit potential

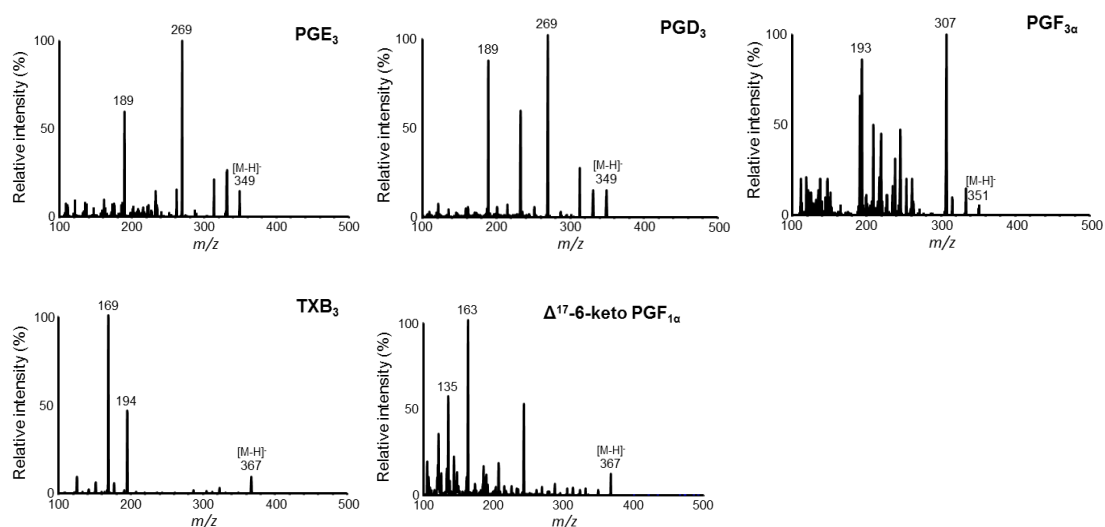


Fig. 3 Product ion mass spectra of PGE₃, PGD₃, PGF_{3α}, TXB₃, and Δ¹⁷-6-keto PGF_{1α}.

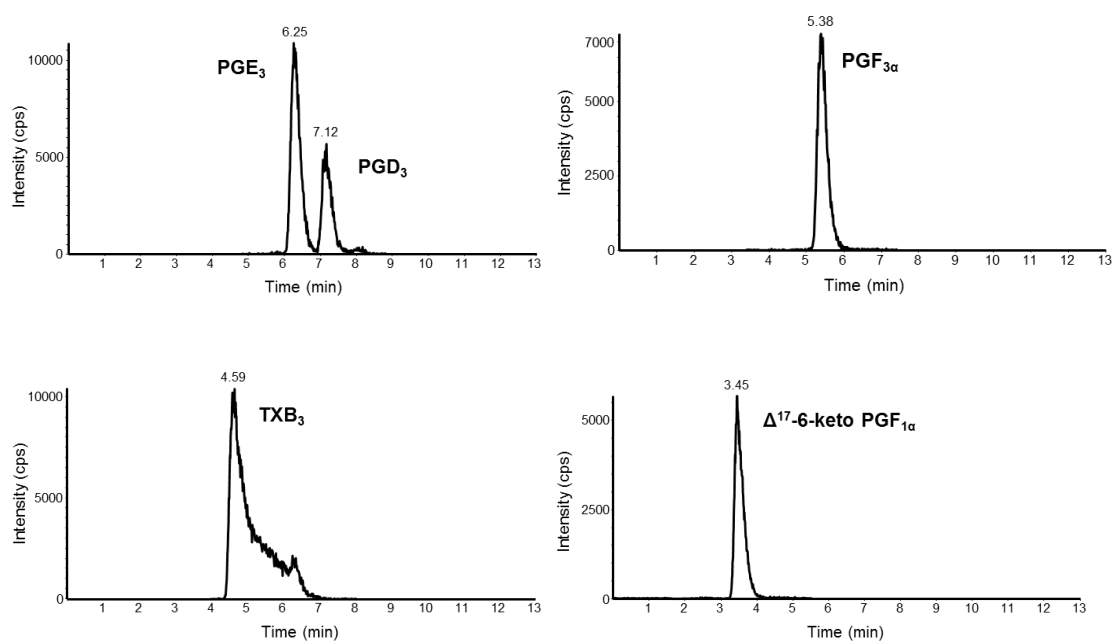


Fig. 4 Representative SRM chromatograms of PGE₃, PGD₃, PGF_{3α}, TXB₃ and Δ¹⁷-6-keto PGF_{1α}.

A mixture of PGE₃, PGD₃, PGF_{3α}, TXB₃, and Δ¹⁷-6-keto PGF_{1α} standards at 5 ng/mL was treated with the Bond Elut® C18 SPE cartridge and separated with CAPCELL PAK C18 MG II (2.0 mm × 150 mm, 3 μm) and 0.15 mL/min of acetonitrile/water/acetic acid (40:60:0.1, v/v/v).

第3節 回収率及びマトリックス効果

細胞外サンプルとしてダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) をマトリックスに使用した結果、回収率は 69.8 - 96.9 %であった (Table 2A)。また、マトリックス効果は Δ^{17} -6-keto PGF_{1 α} (45.1 - 58.2 %) と 6-keto PGF_{1 α} (63.8 - 73.7 %) が他の PG (77.9 - 99.7 %) に比較してマトリックス効果を受けることが示された (Table 2B)。

細胞内サンプルのマトリックスには、リン酸緩衝液 (0.1 M sodium phosphate, 1 mM EDTA, 10 μ M indomethacin, pH 7.4) でホモジナイズした A549 ライセートを、活性炭処理し内因性 PG を除去して使用した。このことから、マトリックス効果を正確には評価できないと考えられたため、全回収率を求め評価することとした。A549 細胞ライセートからの全回収率も同様に、 Δ^{17} -6-keto PGF_{1 α} (52.2 - 63.6 %) と 6-keto PGF_{1 α} (59.0 - 74.7%) が他の PG (75.4 - 89.5 %) (Table 2C) に比較して低かった。

対応する 2-series PG と 3-series PG (例えば、PGE₂ と PGE₃) の全回収率はそれぞれ同程度であったことから、3-series PG の定量においても 2-series PG の重水素標識体を内標準物質として補正可能であると考えた。

Table 2A Extraction recovery of prostanoids in DMEM (n=3).

Prostanoids	Extraction recovery (%)			
	0.1 ng/mL	0.5 ng/mL	5 ng/mL	50 ng/mL
PGE ₃	96.9	89.9	79.9	84.4
PGD ₃	< LLOQ	85.4	71.6	75.5
PGF _{3α}	< LLOQ	91.1	77.9	79.1
TXB ₃	93.3	89.5	81.2	75.5
Δ^{17} -6-keto PGF _{1α}	93.2	74.7	91.7	79.6
PGE ₂	87.4	90.2	75.4	80.8
PGD ₂	< LLOQ	77.2	69.8	76.7
PGF _{2α}	89.2	93.1	72.3	82.9
TXB ₂	83.5	81.7	73.6	75.0
6-keto PGF _{1α}	82.9	78.2	81.9	72.5

Table 2B Matrix effect (n=3).

Prostanoids	Matrix effect (%)			
	0.1 ng/mL	0.5 ng/mL	5 ng/mL	50 ng/mL
PGE ₃	81.1	83.7	93.1	84.2
PGD ₃	< LLOQ	94.9	98.6	89.5
PGF _{3α}	< LLOQ	94.7	96.1	87.5
TXB ₃	95.0	85.3	91.3	81.4
Δ ¹⁷ -6-keto PGF _{1α}	45.1	58.2	56.5	57.5
PGE ₂	95.3	84.6	99.7	88.4
PGD ₂	< LLOQ	92.7	99.2	90.3
PGF _{2α}	95.6	77.9	92.9	86.3
TXB ₂	96.7	84.1	92.3	83.0
6-keto PGF _{1α}	73.7	63.8	68.4	66.6

Table 2C Overall recovery of prostanoids in A549 cells lysate (n=3).

Prostanoids	Overall recovery (%)			
	0.05 ng	0.25 ng	2.5 ng	25 ng
PGE ₃	76.3	86.2	86.3	85.8
PGD ₃	< LLOQ	75.4	76.4	83.4
PGF _{3α}	< LLOQ	80.6	84.8	86.1
TXB ₃	84.1	81.9	82.2	83.8
Δ ¹⁷ -6-keto PGF _{1α}	56.5	53.2	52.2	63.6
PGE ₂	87.4	82.0	85.1	86.6
PGD ₂	< LLOQ	77.8	77.8	79.6
PGF _{2α}	78.9	83.0	83.3	88.7
TXB ₂	89.5	84.2	87.7	88.3
6-keto PGF _{1α}	61.4	62.8	59.0	74.7

第4節 検量線及び日内・日間再現性

第3節までの測定条件にて、細胞外（DMEMをマトリックスに使用）及び細胞内（A549ライセートをマトリックスに使用）サンプルの検量線を作成した。Table 3 に示すように、細胞外測定法は 0.1 または 0.5（PGD₃, PGF_{3α}, PGD₂）から 100 ng/mL、細胞内測定法は 0.05 または 0.25（PGD₃, PGF_{3α}, PGD₂）から 50 ng の範囲で良好な直線性を示した（ $r > 0.999$ ）。

細胞外サンプル測定法の日内・日間再現性を 4 濃度（LLOQ 含む）で検討した。日内においては、精度を示す相対標準偏差（R.S.D.）は 0.8 - 10.9 %、確度を示す相対誤差（R.E.）は -12.8 - 5.5 %であった。また、日間においては、R.S.D.は 0.9 - 9.3 %、R.E.は-8.3 - 3.3 %であった（Table 4A）。

細胞内サンプル測定法の日内・日間再現性を検討したところ、日内においては、R.S.D.は 0.9 - 7.5 %、R.E.は-15.5 - 8.6 %であった。また、日間においては、R.S.D.は 1.2 - 9.9 %、R.E.は-7.8 - 1.6 %であった（Table 4B）。

Table 3 Calibration curves for the 2-series PG and 3-series PG.

Prostanoids	Extracellular measurement				Intracellular measurement			
	Range (ng/mL)	Slope	Intercept	r	Range (ng)	Slope	Intercept	r
PGE ₃	0.1-100	0.282	0.0314	0.9997	0.05-50	0.597	-0.0078	0.9999
PGD ₃	0.5-100	0.260	0.0211	0.9999	0.25-50	0.598	-0.0327	1.0000
PGF _{3α}	0.5-100	0.434	0.00747	0.9996	0.25-50	0.906	-0.0387	0.9999
TXB ₃	0.1-100	0.239	0.00155	0.9999	0.05-50	0.475	-0.00704	0.9999
Δ ¹⁷ -6-keto PGF _{1α}	0.1-100	0.160	0.000273	1.0000	0.05-50	0.432	-0.0118	1.0000
PGE ₂	0.1-100	0.408	0.0118	0.9999	0.05-50	0.714	0.00572	1.0000
PGD ₂	0.5-100	0.347	0.00152	0.9998	0.25-50	0.631	-0.00722	1.0000
PGF _{2α}	0.1-100	0.357	0.00745	1.0000	0.05-50	0.645	0.011	0.9999
TXB ₂	0.1-100	0.236	-0.00143	0.9999	0.05-50	0.405	-0.00651	0.9999
6-keto PGF _{1α}	0.1-100	0.349	0.00899	0.9999	0.05-50	0.589	0.00312	1.0000

Table 4A Intra-day and inter-day reproducibilities of prostanoids in DMEM (extracellular measurement).

Prostanoids	Extracellular intra-day (n=6)				Extracellular inter-day (n=6)			
	Spiked (ng/mL)	Found (ng/mL)	R.S.D. (%)	R.E. (%)	Spiked (ng/mL)	Found (ng/mL)	R.S.D. (%)	R.E. (%)
PGE ₃	0.1	0.0947	4.6	-5.4	0.1	0.0918	6.4	-8.3
	0.5	0.525	4.7	5.0	0.5	0.507	3.0	1.4
	5	5.26	7.1	5.1	5	5.21	2.6	4.1
	50	52.6	4.9	5.2	50	50.9	1.9	1.8
PGD ₃	0.5	0.441	9.0	-11.8	0.5	0.512	4.3	2.3
	5	5.24	1.8	4.7	5	5.01	6.2	0.3
	50	51.8	2.6	3.5	50	50.4	4.1	0.8
PGF _{3α}	0.5	0.504	6.7	0.8	0.5	0.516	1.0	3.2
	5	4.96	1.8	-0.8	5	5.05	5.6	0.9
	50	52.7	2.9	5.5	50	50.7	3.2	1.3
TXB ₃	0.1	0.0872	10.0	-12.8	0.1	0.0945	6.2	-5.6
	0.5	0.510	3.7	2.1	0.5	0.486	7.3	-2.8
	5	5.07	2.5	1.4	5	5.13	2.2	2.6
	50	52.0	2.7	4.0	50	51.3	3.0	2.6
Δ ¹⁷ -6-keto PGF _{1α}	0.1	0.0942	10.9	-5.8	0.1	0.0958	9.3	-4.3
	0.5	0.498	8.4	-0.5	0.5	0.488	7.1	-2.3
	5	5.24	2.3	4.7	5	5.17	7.4	3.3
	50	50.6	4.6	1.2	50	50.6	2.6	1.2
PGE ₂	0.1	0.0908	7.2	-9.2	0.1	0.0917	2.0	-8.3
	0.5	0.510	2.6	2.0	0.5	0.502	2.3	0.3
	5	5.18	0.8	3.7	5	5.12	2.3	2.4
	50	51.7	2.8	3.5	50	50.1	1.7	0.1
PGD ₂	0.5	0.495	1.8	-1.0	0.5	0.492	2.8	-1.5
	5	5.01	2.1	0.3	5	5.02	3.4	0.5
	50	50.4	1.9	0.7	50	50.0	0.7	-0.1
PGF _{2α}	0.1	0.0960	4.1	-4.1	0.1	0.0991	2.6	-0.9
	0.5	0.480	4.4	-3.9	0.5	0.493	3.7	-1.4
	5	4.99	3.6	-0.3	5	5.03	2.8	0.7
	50	50.8	1.3	1.7	50	49.5	2.0	-0.9
TXB ₂	0.1	0.0903	5.1	-9.7	0.1	0.0938	3.4	-6.2
	0.5	0.500	2.5	0.0	0.5	0.495	1.4	-1.1
	5	5.07	2.0	1.3	5	5.11	1.3	2.1
	50	51.4	1.4	2.8	50	50.4	1.2	0.8
6-keto PGF _{1α}	0.1	0.0977	4.9	-2.3	0.1	0.0964	5.8	-3.6
	0.5	0.491	2.6	-1.9	0.5	0.485	1.6	-3.0
	5	5.03	1.4	0.6	5	5.09	3.2	1.8
	50	50.7	0.9	1.4	50	50.3	0.9	0.6

Table 4B Intra-day and inter-day reproducibilities of prostanoids in A549 cell lysate (intracellular measurement).

Prostanoids	Intracellular intra-day (n=6)				Intracellular inter-day (n=6)			
	Spiked (ng)	Found (ng)	R.S.D. (%)	R.E. (%)	Spiked (ng)	Found (ng)	R.S.D. (%)	R.E. (%)
PGE ₃	0.05	0.0505	4.2	1.1	0.05	0.0488	7.9	-2.3
	0.25	0.257	4.1	2.9	0.25	0.251	2.1	0.3
	2.5	2.72	2.5	8.6	2.5	2.45	5.0	-2.1
	25	27.1	1.7	8.2	25	24.8	3.5	-1.0
PGD ₃	0.25	0.258	4.4	3.1	0.25	0.254	4.1	1.4
	2.5	2.49	3.2	-0.5	2.5	2.48	3.2	-0.9
	25	25.0	1.3	-0.1	25	25.3	3.4	1.1
PGF _{3α}	0.25	0.251	3.2	0.4	0.25	0.254	3.7	1.6
	2.5	2.54	1.4	1.5	2.5	2.36	3.5	-5.5
	25	26.1	3.1	4.4	25	24.5	1.8	-1.9
TXB ₃	0.05	0.0484	5.0	-3.3	0.05	0.0482	6.6	-3.5
	0.25	0.262	2.7	4.8	0.25	0.245	2.3	-2.0
	2.5	2.63	2.0	5.2	2.5	2.47	2.7	-1.4
	25	25.8	1.6	3.1	25	24.8	1.2	-0.9
Δ ¹⁷ -6-keto PGF _{1α}	0.05	0.0486	3.3	-2.9	0.05	0.0483	7.2	-3.4
	0.25	0.245	3.4	-1.9	0.25	0.244	2.8	-2.3
	2.5	2.48	2.3	-0.9	2.5	2.49	9.9	-0.3
	25	24.7	7.5	-1.3	25	25.0	6.4	-0.1
PGE ₂	0.05	0.0464	3.2	-7.2	0.05	0.0465	8.1	-7.0
	0.25	0.247	3.0	-1.1	0.25	0.243	2.8	-3.0
	2.5	2.41	2.8	-3.7	2.5	2.42	2.5	-3.4
	25	24.4	1.8	-2.3	25	24.1	2.3	-3.7
PGD ₂	0.25	0.233	3.6	-6.8	0.25	0.231	6.5	-7.7
	2.5	2.35	1.9	-6.1	2.5	2.31	4.3	-7.8
	25	23.8	0.9	-4.9	25	23.1	2.3	-7.7
PGF _{2α}	0.05	0.0464	6.5	-7.2	0.05	0.0482	3.8	-3.6
	0.25	0.244	2.5	-2.3	0.25	0.242	2.1	-3.3
	2.5	2.49	3.1	-0.3	2.5	2.43	4.0	-2.7
	25	24.9	2.1	-0.3	25	24.9	2.4	-0.3
TXB ₂	0.05	0.0422	4.1	-15.5	0.05	0.0489	7.5	-2.2
	0.25	0.241	3.8	-3.5	0.25	0.243	3.1	-2.7
	2.5	2.42	2.6	-3.1	2.5	2.47	3.2	-1.3
	25	24.8	2.4	-0.7	25	24.6	2.1	-1.6
6-keto PGF _{1α}	0.05	0.0436	6.8	-12.7	0.05	0.0475	6.3	-4.9
	0.25	0.243	1.5	-2.7	0.25	0.239	2.8	-4.3
	2.5	2.37	2.1	-5.2	2.5	2.42	2.8	-3.2
	25	24.5	2.2	-2.0	25	24.5	1.6	-2.1

第 5 節 考察

本章では、トランスポーターを介した PG 細胞外放出を標的とすることで期待される細胞選択性の検証、及び PG バランスに及ぼす影響の評価を行うための PG 測定法の確立を目指した。細胞選択性を検証するために複数の細胞株を評価する必要がある、それぞれが異なる PG 生合成量を示す可能性が高い。多くの細胞株に対応するためには高感度な分析が必要と考えた。また、PG バランスに及ぼす影響の評価に向け 3-series PG に着目したことから、2-series PG と 3-series PG を網羅的に測定できる手法が必要であった。さらに、速度論パラメーターに加え細胞内量に関する情報は PG 輸送の選択性を考察する上で重要であり、細胞外量とは切り離して測定する方法が必要であった。以上の条件を全て網羅する分析法は報告されていなかった。

これまで細胞株を用いた研究に加え、ヒトから採取したサンプル（血液、尿）を用いた研究において、LC-MS/MS は網羅的かつ高感度・高精度に PG を分析可能な手法として汎用されており⁵⁰⁻⁵⁴、過去に 2-series PG 細胞内外測定法の構築に応用した⁴⁹。この測定法の対象化合物に 3-series PG を加えることにより目的とする測定法を確立できると考え着手した。

3-series PG は 2-series PG の ω -3 位に二重結合が付与された化学構造であることから、MS での分離が可能であった。しかしながら、PGE₃ と PGD₃ はモニタリングイオンが同一となることから、液体クロマトグラフィーでの分離が必要であった。そこで、より高い理論段数を得るために粒子径がより小さい分析カラム（5 μ m から 3 μ m へ変更）を使用し、その結果 PGE₃ と PGD₃ を良好に分離することに成功した。

各 3-series PG のクロマトグラムのうち、TXB₃ はブロードかつ 4.6 min と 6.3 min でピークが出現した。TXB₃ は TXB₂ と同様にヘミアセタール構造を有し、TXB₂ は 11- α -OH-TXB₂ と 11- β -OH-TXB₂、開環したアルデヒド体の 3 構造が平衡状態で存在することが知られている⁵⁵。この平衡状態は pH によって傾けることが可能ではあるものの、低 pH（1.6 以下）の場合 TXB₂ が分解する恐れがあり、高 pH の場合は脱プロトン化するため逆相カラムによる分離分析が困難であると考えられている⁵⁵。また、カラム温度を変更することによりピーク形

状を改善した報告もあるものの⁵⁶、PGE₃とPGD₃の分離に影響を及ぼす可能性が考えられた。結果として、TXB₂とTXB₃の定量値の日内・日間変動は許容可能な範囲と考えられたことから、さらなる改善策は執らないこととした。

マトリックス成分によるイオン化の影響を検討した結果、6-keto PGF_{1α}とΔ¹⁷-6-keto PGF_{1α}は他のPGに比べイオン化抑制を受けることが判明した。過去の報告でもヒト尿サンプルの測定において逆相の固相抽出カラムを用いて前処理を行った際、6-keto PGF_{1α}はイオン化抑制を受けたことが報告されているものの⁵⁴、その原因成分は明らかとなっていない。6-keto PGF_{1α}は重水素標識体が市販されており、またΔ¹⁷-6-keto PGF_{1α}は6-keto PGF_{1α}と同程度のイオン化抑制を受けたことから、6-keto PGF_{1α}の重水素標識体を内標準物質とすることで補正が可能と考えた。結果として定量値の日内・日間変動は許容可能な範囲と考えられ、イオン化抑制の影響を補正できたと考えられる。

以上から、本章で2-series PGと3-series PGの細胞内外同時測定法を構築した。次章では構築した測定法を応用し、ABCC4阻害効果の細胞選択性と、ABCC4阻害時のPGバランス変化について評価を行うこととした。

第2章 ABCC4 阻害効果の細胞選択性及び ABCC4 阻害時の PG バランスの変化の解析

第1節 序

本章では PG 細胞外放出トランスポーターとして唯一報告されている、ABCC4 を治療標的とすることの有用性を評価するために、ABCC4 阻害効果の細胞選択性及び ABCC4 阻害時の PG バランスの変化を調べることにした。

序論で記述の通り、ABCC4 阻害効果の細胞選択性を調べることにより、PG の生理作用を選択的に制御できる可能性を評価できると考えられる。ABCC4 は血液脳関門や尿細管管腔側等様々な組織に発現し、体内に入り込んだ異物の排出に寄与と考えられている⁵⁷。ABCC4 は幅広い発現分布を示すことから、病巣部位の ABCC4 を介した PG 細胞外放出を選択的に抑制することが有効かつ安全な治療に必要であり、その評価は重要と考えられる。

また、ABCC4 は既に PGE₁、PGE₂、PGF_{2α}、TXB₂ を輸送基質とし、互いに ABCC4 に対する親和性が異なることが報告されている^{38, 39}。しかしながら、ABCC4 を介した細胞外放出において網羅的に PG の動態を解析した報告はなく、ABCC4 阻害によって PG バランスが変化するか予測するための情報が不足している。そのために、PG 輸送の速度論パラメーターに加え細胞内の推定 PG 濃度の情報を収集し、ABCC4 を介した細胞外放出における PG 選択性を評価する必要があると考えた。

そこで、前章で構築した細胞内・細胞外 2-series PG・3-series PG 測定法を駆使し、まず由来の異なる複数の培養細胞に ABCC4 阻害薬を使用し、細胞選択的に PG 細胞外放出を抑制できるか検証することとした。次に ABCC4 阻害薬使用時の 2-series PG と 3-series PG の細胞外量比の変化を調べ、その変化と速度論パラメーター及び細胞内の推定 PG 濃度の関連性から、ABCC4 阻害によって PG バランス変化が生じる可能性があるか検証することとした。

第2節 ABCC4によるPGD₂、PGD₃、PGE₃、PGF_{3α} 輸送の特性解析

これまでAAから生合成されるPGのうち、PGD₂、PGL₂、TXA₂はABCC4の輸送基質となるか検証されていない。しかし、PGL₂、TXA₂は非酵素的に速やかに分解されることから輸送基質か否か検証することが困難である⁵。そのため、本研究ではPGD₂を加えた3種のAA由来2-series PG (PGD₂、PGE₂、PGF_{2α})を対象にすることとした。また、対応するEPA由来3-series PG (PGD₃、PGE₃、PGF_{3α})も評価対象とした。

既にABCC4の輸送基質であることが明らかであるPGE₂、PGF_{2α}を除く4種のPGについて、ABCC4過剰発現HEK293細胞(HEK/4.63)及びcontrol HEK293細胞(HEK/P.B.)から作製した膜小胞を用いて輸送実験を行った。HEK/4.63膜小胞内へのPGD₂、PGD₃、PGE₃、PGF_{3α}の蓄積はATP存在下で顕著に増大し、取り込み開始5分で平衡に到達する時間依存的な膜小胞内への取り込みが観察された(Fig. 5)。膜小胞内に蓄積したPGは受動拡散もしくは他のトランスポーターを介して速やかに膜小胞外に拡散することが報告されているため³⁸、短時間で平衡へ到達したと考えられる。また、HEK/P.B.膜小胞でもATP存在下でわずかにPG取り込みが増加したが、HEK293細胞は内因的にABCC4を発現するためであると考えられる。

次に取り込み時間を30秒に設定し、ATP依存的PG輸送の濃度依存性について検討した(Fig. 6)。いずれのPGも高濃度存在下で輸送速度の飽和が確認された。Michaelis-Menten型曲線にフィッティングした結果、 K_m はそれぞれ 0.6 ± 0.1 (PGD₂)、 1.1 ± 0.4 (PGD₃)、 2.9 ± 0.1 (PGE₃)、 12.1 ± 1.3 (PGF_{3α}) μM であった。ABCC4は基質結合部位を複数持つことが示唆されているが⁵⁸、Eadie-Hofstee plotでいずれも一直線に近似され、PGの基質結合部位は一か所であることが示された。同様の実験系でPGE₂、PGF_{2α}についても評価し、全6種のPGのABCC4を介した輸送特性をTable 5にまとめた。

PGの濃度依存的な輸送速度の検証のみでは、過剰発現させたトランスポーターの表面に特異的に吸着した可能性を排除できない⁵⁹。特異的吸着が起こっている場合には、そのトラ

ンスポーターの基質や阻害薬の効果が既報と大幅に異なることが予想される。このことから次に、ABCC4 の典型的基質・阻害薬共存下で PG 輸送が抑制されるか検討を行い⁵⁷、ATP 依存的 PG 輸送が ABCC4 を介していることをさらに裏付けることとした (Table 6) 。過去に報告された IC₅₀ がそれぞれ <1 - 12 μ M、2 - 10 μ M であったジピリダモール、MK571 は、50 μ M 存在下で ATP 依存的 PG 輸送をそれぞれ 1.0 - 26 %、-2.2 - 6 %まで強力に阻害した。また、IC₅₀ または K_m 付近で使用した 10 μ M インドメタシン (IC₅₀=5 - 22 μ M) 、200 μ M 葉酸 (K_m=170 μ M) 、50 μ M エストラジオール-17 β -グルクロニド (E₂17 β G : K_m=30 μ M) はそれぞれ 16 - 42 %、32 - 59 %、23 - 36 %まで阻害した。一方、500 μ M プロベネシド (IC₅₀=100 μ M) 、1000 μ M cGMP (K_m = 10 - 180 μ M) は、既報の IC₅₀、K_m の 5 倍程度高濃度に共存させても、それぞれ 49 - 86 %、50 - 75 %までの阻害にとどまった。しかし、プロベネシド、cGMP による阻害効果は既報の結果 (500 μ M プロベネシドで PGE₂、PGF_{2 α} 、TXB₂ 輸送を約 50 - 70 %まで抑制⁴¹、1000 μ M cGMP で E₂17 β G 輸送を 48%まで抑制⁶⁰) と概ね一致した。

以上の ABCC4 過剰発現細胞から作製した膜小胞を用いた輸送実験の結果より、PGD₂、PGE₃、PGD₃、PGF_{3 α} は ABCC4 の輸送基質であることを明らかとし、個々の速度論パラメーターを導出した。続いて細胞株を用いて、ABCC4 阻害効果の細胞選択性及び ABCC4 阻害時の PG バランスの変化について解析を行うこととした。

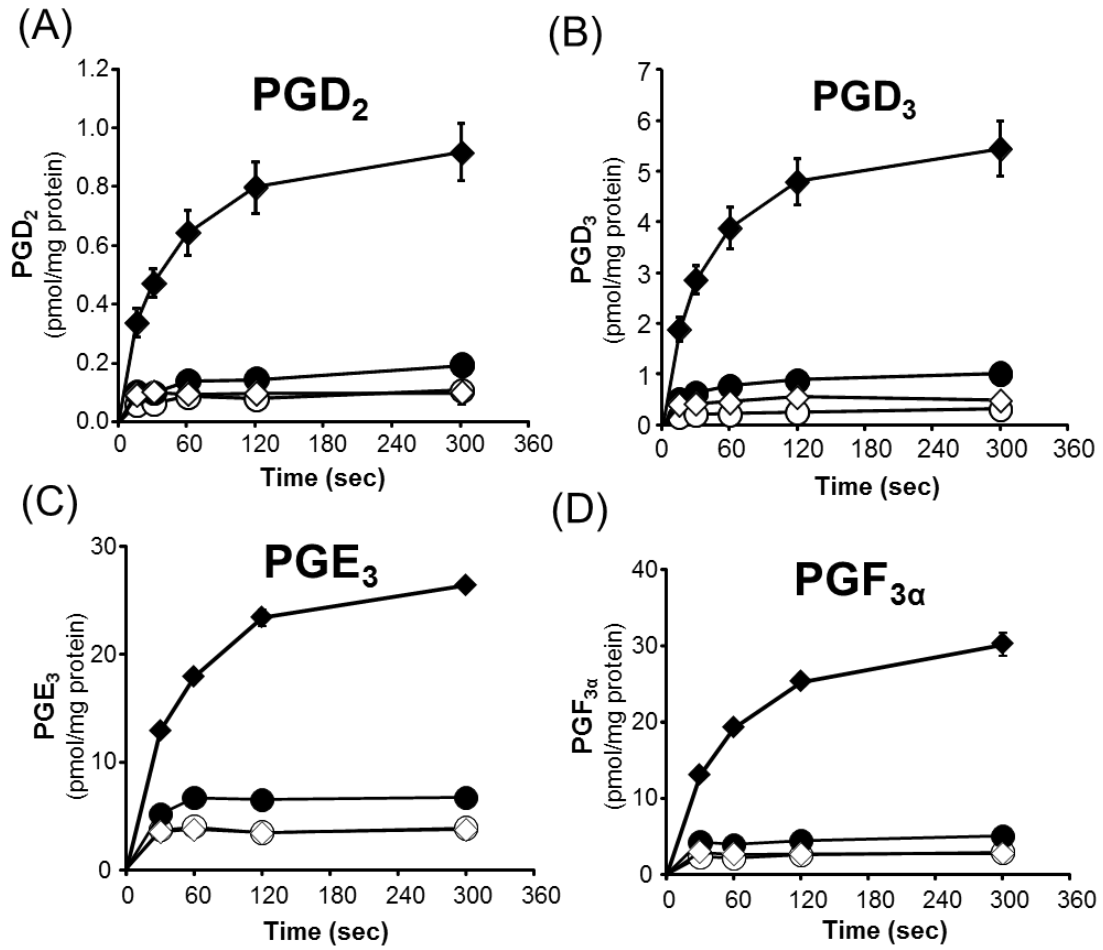


Fig. 5 Time-dependent transport of PGD₂, PGD₃, PGE₃, and PGF_{3α} by ABCC4.

Time-dependent transport of (A) PGD₂, (B) PGD₃, (C) PGE₃, (D) PGF_{3α} into inside-out membrane vesicles. Membrane vesicles (25 μg) prepared from HEK/P.B. cells (circles) or HEK/4.63 cells (diamonds) were incubated at 37°C with 0.1 μM PGD₂, 0.5 μM PGD₃, 1.0 μM PGE₃, or 2.5 μM PGF_{3α} in the presence of ATP (filled symbols) or AMP (open symbols). Each point represents the mean ± S.E. (n = 3).

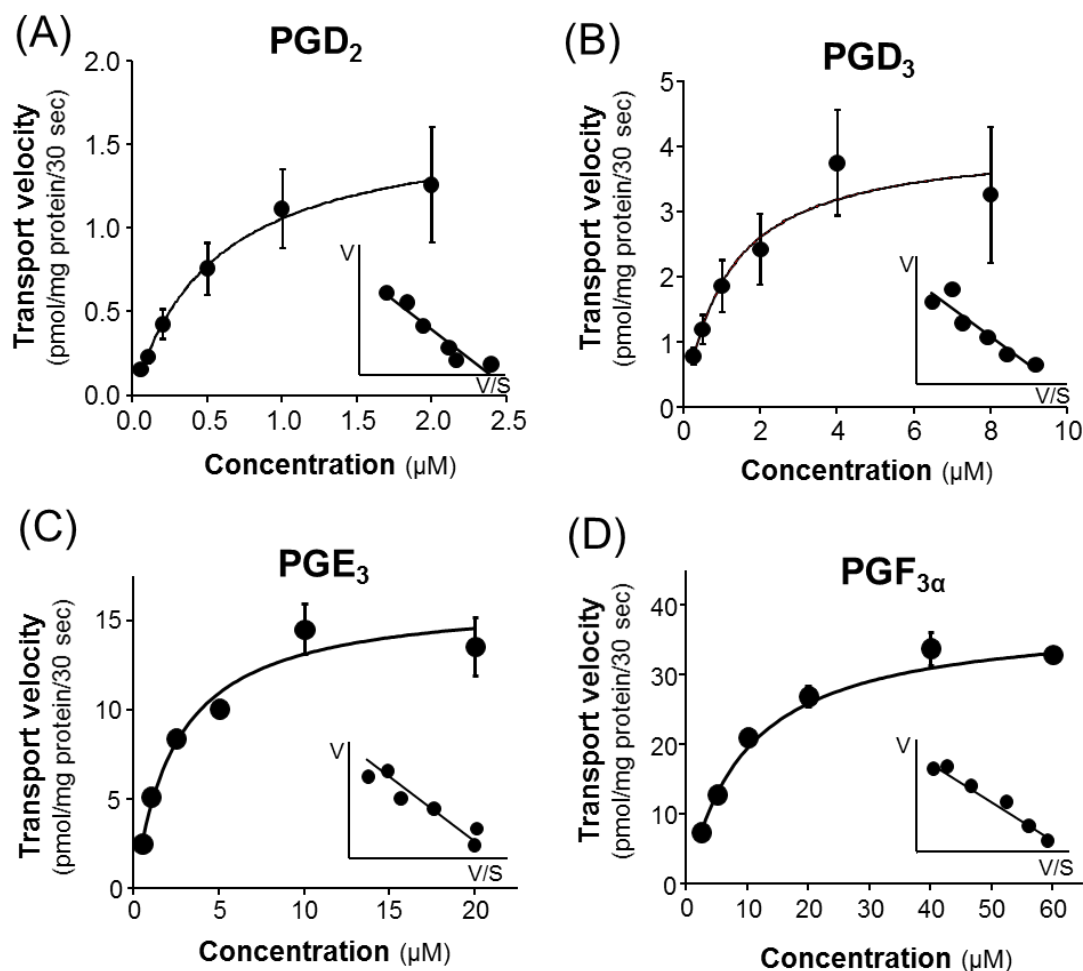


Fig. 6 Concentration-dependent transport of PGD₂, PGD₃, PGE₃, and PGF_{3α} by ABCC4.

Concentration-dependent transport of (A) PGD₂, (B) PGD₃, (C) PGE₃, (D) PGF_{3α} via ABCC4. Membrane vesicles (25 μg) prepared from HEK/P.B. cells or HEK/4.63 cells were incubated at 37°C at the time of 30 sec in the presence of PGD₂, PGD₃, PGE₃, or PGF_{3α}. Rates of ATP-dependent transport were calculated by subtracting the uptake in the presence of AMP from that in the presence of ATP. Each point represents the mean ± S.E. (n = 3). Inset: Eadie Hofstee plot.

Table 5 Kinetic parameters of 2-series PGs and 3-series PGs transport by ABCC4.

	K_m (μM)	V_{max} (pmol/mg protein/30 sec)	V_{max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{mg protein}/30\text{sec}$)
2-series PGs			
PGE ₂	0.8 \pm 0.1	3.2 \pm 0.2	4.2
PGF _{2α}	5.3 \pm 0.7	26.3 \pm 1.6	5.0
PGD ₂	0.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	3.0
3-series PGs			
PGE ₃	2.9 \pm 0.1	15.4 \pm 3.9	5.3
PGF _{3α}	12.1 \pm 1.3	33.0 \pm 6.6	2.7
PGD ₃	1.1 \pm 0.4	4.1 \pm 0.2	3.6

Rates of ATP-dependent transport were calculated by subtracting the uptake in the presence of AMP from that in the presence of ATP for three independent experiments. The values of K_m and V_{max} were calculated from Eadie-Hofstee plots. Data represent mean \pm S.E. (n = 3).

Table 6 Inhibitory effect of ABCC4 substrates and inhibitors to PGD₂, PGD₃, PGE₃, and PGF_{3 α} transport by ABCC4.

Inhibitors	Concentration (μM)	ATP-dependent transport (% of control \pm S.E.)			
		PGD ₂	PGD ₃	PGE ₃	PGF _{3α}
		(0.1 μM)	(0.5 μM)	(1 μM)	(2.5 μM)
Dipyridamole	50	6 \pm 2 **	1 \pm 4 **	20 \pm 4 **	26 \pm 6 **
MK571	50	3 \pm 3 **	-2.2 \pm 2.9 **	6 \pm 1 **	6 \pm 4 **
Probenecid	500	56 \pm 7 **	49 \pm 6 **	86 \pm 1	74 \pm 4 *
Indomethacin	10	26 \pm 6 **	16 \pm 4 **	28 \pm 4 **	42 \pm 8 **
Folic acid	200	59 \pm 4 **	32 \pm 4 **	46 \pm 2 **	37 \pm 4 **
E ₂ 17 β G	50	36 \pm 8 **	23 \pm 3 **	30 \pm 5 **	34 \pm 1 **
cGMP	1000	74 \pm 6	52 \pm 3 **	64 \pm 5 **	75 \pm 1

Membrane vesicles (25 μg) from HEK/4.63 cells were incubated with PGD₂ (0.1 μM), PGD₃ (0.5 μM), PGE₃ (1.0 μM), or PGF_{3 α} (2.5 μM) at 37°C. Rates of ATP-dependent transport were calculated by subtracting the uptake in the presence of AMP from that in the presence of ATP. Transport is expressed as percent of uptake in the absence of inhibitor. Each value represents the mean \pm S.E. (n = 3).

*; $p < 0.05$

**; $p < 0.01$

E₂17 β G : estradiol 17 β -glucuronide

cGMP : cyclic guanosine monophosphate

第3節 ABCC4 阻害効果の細胞選択性の解析

前節の結果から、PG の中でも PGD₂ が ABCC4 に対し高い親和性を示す輸送基質であることがわかった。そのため、ABCC4 は PGD₂ の細胞外放出における寄与が大きい可能性を考えた。そこでまず、PGD₂ を産生・放出することが既知の細胞株として、ヒト小脳髄芽細胞由来 TE671 細胞⁶¹ とヒト肥満細胞由来 HMC-1 細胞^{62,63} を用いて PGD₂ 細胞外放出に対する ABCC4 阻害薬の効果をそれぞれ調べることにした。本検討では ABCC4 阻害薬として MK571 及び CeefourinTM 1 を使用することとした。MK571 は古くから ABCC4 阻害薬として使用されていたが、ABCC1 (IC₅₀ = 1.8 - 2.7 μM) や ABCC2 (IC₅₀ = 3.3 μM)、ABCC5 (IC₅₀ = 15.9 μM) 等 ABCC ファミリーを幅広く阻害することが知られ⁶⁴⁻⁶⁶、また organic anion transporting polypeptides (OATPs) の阻害も示すことが明らかとなってきた⁶⁷。一方、CeefourinTM 1 は 2014 年に ABCC4 選択的阻害薬として開発され、10 μM の濃度で ABCC1、ABCC2、ABCC3、ABCC5 に対する阻害効果を示さないことがわかっている⁶⁸。また、PGT も阻害しないことがわかっており⁶⁹、MK571 に比べ他のトランスポーターへの影響が小さいものと期待し使用した。ABCC4 過剰発現細胞から作製した膜小胞を用いて阻害実験を行った結果、CeefourinTM 1 の K_i は約 0.15 μM であり (Fig. 7A, B)、10 μM CeefourinTM 1 は 50 μM MK571 と同等の阻害効果を示すことがわかった (Fig. 7C)。

TE671 細胞、HMC-1 細胞ともに ABCC4 mRNA は発現するものの、ABCC4 タンパク質発現量は HMC-1 細胞で高く、TE671 細胞で低いことが判明した (Fig. 8A, B)。TE671 細胞の細胞外 PGD₂ 量は CeefourinTM 1 (10 μM) で減少しなかったが、MK571 (50 μM) は細胞外 PGD₂ 量を有意に減少させた (Fig. 8C)。MK571 は細胞内 PGD₂ 量も有意に減少させたが、その一方で CeefourinTM 1 は減少させなかったことから (Fig. 8D)、MK571 は PGD₂ の生合成過程に影響を及ぼしている可能性が考えられた。細胞外/細胞内量比を求めることで生合成の変動を補正して細胞外放出を評価できると考え算出したところ^{40,70,71}、どちらの ABCC4 阻害薬によっても変化しなかった (Fig. 8E)。

続いて、TE671 細胞からの PGD₂ 放出にはマクロファージからの PGE₂ 放出と同様エキソサイトーシスに関わると考えた^{72,73}。この可能性を検証するためにエキソサイトーシス阻害薬である Exo 1 を使用することとした。Exo 1 は ADP-ribosylation factor 1 活性を阻害し、小胞体とゴルジ体間の小胞輸送を阻害することでエキソサイトーシスを阻害する⁷⁴。TE671 細胞を Exo 1 (100 μM) で 30 分前処理したところ、PGD₂ 細胞外量は 65 %減少した (Fig. 9A)。また、細胞内量は変化せず (Fig. 9B)、算出された PGD₂ 細胞外/細胞内量比は有意に低下した (Fig. 9C)。以上の結果から、TE671 細胞では PGD₂ 細胞外放出に ABCC4 ではなくエキソサイトーシスが関与し、ABCC4 は TE671 細胞からの PGD₂ 細胞外放出に寄与しないことを示した。

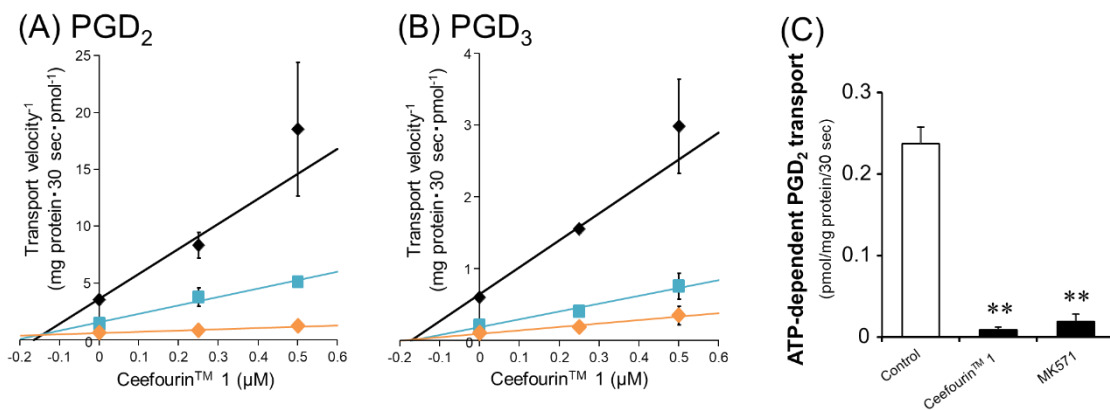


Fig. 7 Inhibitory effects of Ceefourin™ 1 and MK571 to the transport by ABCC4.

(A, B) The inhibitory effects of Ceefourin 1 to ABCC4-dependent transport of (A) PGD₂ and (B) PGD₃. Membrane vesicles (25 μg) prepared from HEK/4.63 cells were incubated at 37°C for 30 sec. Rates of ATP-dependent transport were calculated by subtracting uptake in the presence of AMP from that in the presence of ATP. The inhibitory studies were conducted in the presence (0.25 μM, 0.5 μM) or absence of Ceefourin™ 1. (A) Black, blue, and green lines represent the results of 0.1 μM, 0.3 μM, and 1 μM PGD₂, respectively. (B) Black, blue, and green lines represent the results of 0.3 μM, 1 μM, and 3 μM PGD₃, respectively. Each point represents the mean ± S.D. (n = 3). (C) Inhibitory effect of 10 μM Ceefourin™ 1 and 50 μM MK571 to the PGD₂ transport by ABCC4. Membrane vesicles (25 μg) from HEK/4.63 cells were incubated with PGD₂ (0.1 μM), at 37 °C. Rates of ATP-dependent transport were calculated by subtracting the uptake in the presence of AMP from that in the presence of ATP. Transport is expressed as percent of uptake in the absence of inhibitor. Each value represents the mean ± S.E. (n = 3).

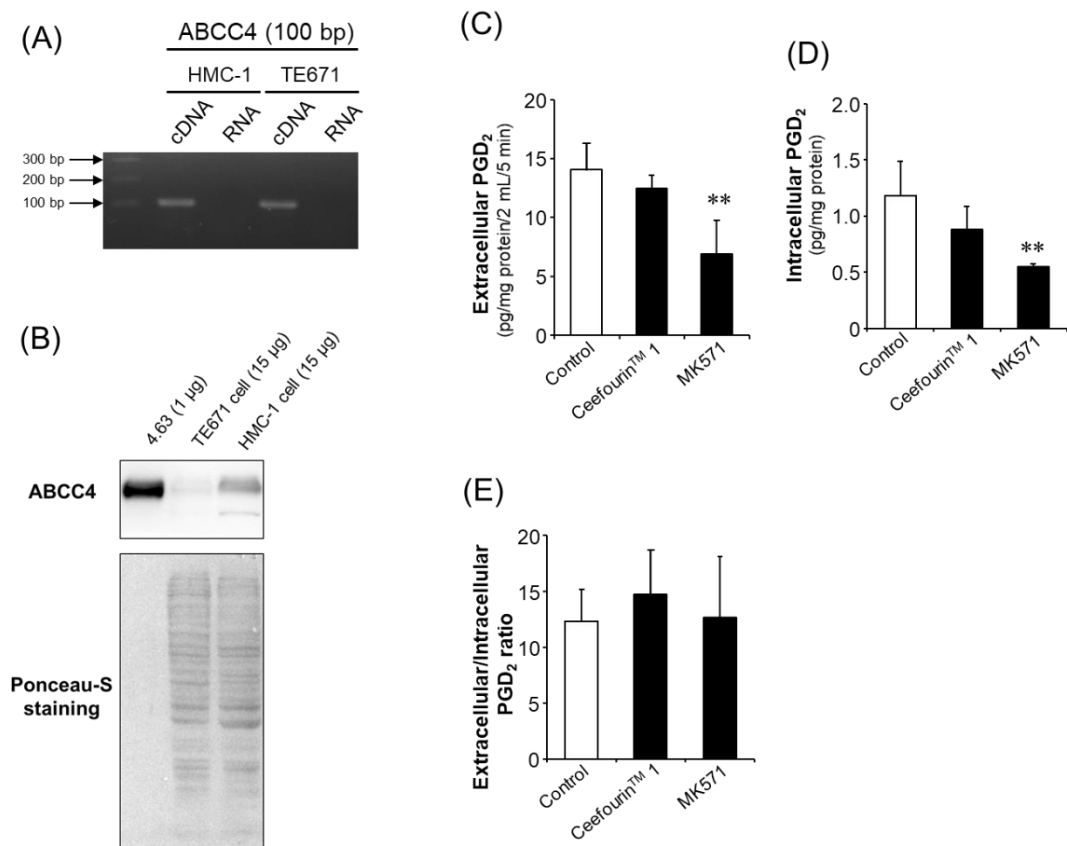


Fig. 8 ABCC4 expression in TE671 cells and HMC-1 cells and effect of ABCC4 inhibitor to extracellular and intracellular PGD₂ in TE671 cells.

(A) ABCC4 mRNA expression in TE671 cells and HMC-1 cells. Complementary DNA was acquired by transcription of total RNA. Complementary DNA (50 ng) and RNA (as a negative control) were used as template for PCR. (B) ABCC4 protein expression in TE671 cells and HMC-1 cells. (C-E) Inhibitory effects of 10 µM CeefourinTM 1 or 50 µM MK571 on (C) extracellular levels, (D) intracellular levels, and (E) extracellular/intracellular levels ratio of PGD₂ in TE671 cells. TE671 cells (4×10^5 cells/60 mm dish) were treated with 2 mL DMEM (serum free) containing 20 µM AA for a day. After aspiration of DMEM containing AA, 2 mL DMEM (serum free) with or without 10 µM CeefourinTM 1 or 50 µM MK571 was added. After 5 min, the media and cells were harvested to quantify extracellular and intracellular levels of PGD₂. The extracellular/intracellular ratio of the levels of PGD₂ was then calculated. Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Representative results are shown. **, $p < 0.01$

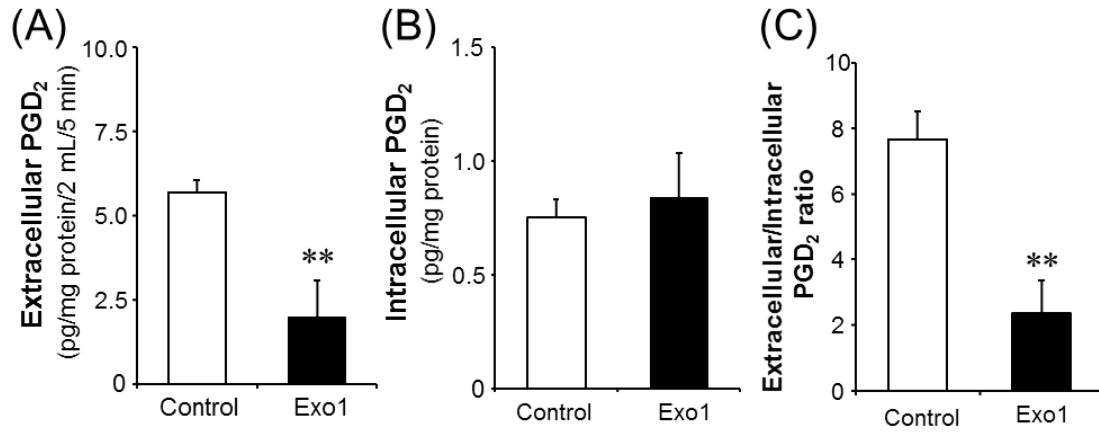


Fig. 9 Effect of exocytosis inhibitor to extracellular and intracellular PGD₂ in TE671 cells.

Inhibitory effects of 100 μ M Exo 1 on (A) extracellular levels, (B) intracellular levels, and (C) extracellular/intracellular levels ratio of PGD₂ in TE671 cells. TE671 cells (4×10^5 cells/60 mm dish) were treated with 2 mL DMEM (serum free) containing 20 μ M AA for a day. After aspiration of DMEM containing AA, TE671 cells were treated with or without 100 μ M Exo 1 in DMEM (serum free) for 30 min. After wash with PBS (–), 2 mL DMEM (serum free) was added. After 5 min, the media and cells were harvested to quantify extracellular and intracellular levels of PGD₂. The extracellular/intracellular ratio of the levels of PGD₂ was then calculated. Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Representative results are shown. **, $p < 0.01$

次に HMC-1 細胞からの PGD₂ 細胞外放出に対する ABCC4 阻害薬の効果を解析することとした。HMC-1 細胞に 50 μ M AA を添加し 24 時間後に洗浄、新しい培地（血清不含）に交換後 5 分で、培地中及び細胞ペレット中に定量可能な量の PGD₂ が存在することを確認した。この条件下で 10 μ M CeefourinTM 1、50 μ M MK571 による培地中の細胞外 PGD₂ 量の変化を調べた結果、それぞれ 53 %、31 %の有意な減少を示した (Fig. 10A)。このことから、TE671 細胞とは異なり、HMC-1 細胞において ABCC4 阻害薬は PGD₂ 細胞外量を減少させることを示した。その一方で、細胞ペレット中の細胞内 PGD₂ 量は変化せず、PGD₂ の蓄積が見られなかった (Fig. 10B)。この原因として細胞内での代謝の影響を考え、主要な PG 代謝酵素である 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) を阻害する CAY10397 (50 μ M) ⁷⁵ を用いた。しかし、細胞内の PGD₂ 蓄積は見られなかったことから、少なくとも 15-PGDH を介した代謝は関与しないと考えられた (Fig. 11)。結果として PGD₂ 細胞外/細胞内量比は有意な低下を示し、ABCC4 阻害薬による PGD₂ 細胞外放出抑制が示された (Fig. 10C)。

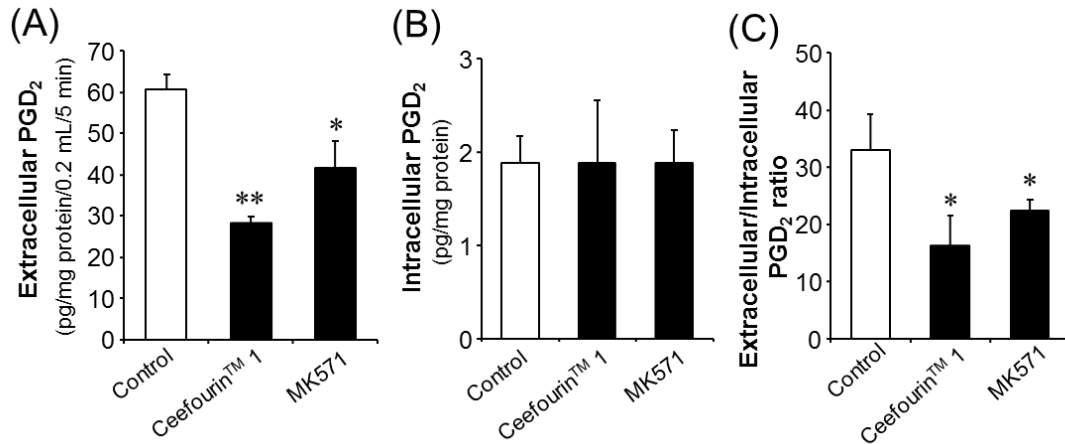


Fig. 10 Effect of ABCC4 inhibitor to extracellular and intracellular PGD₂ in HMC-1 cells after 50 μ M AA exposure for 24 hours.

HMC-1 cells were treated with culture media (IMDM with 10% FBS and 1.2 mM 1-thioglycerol) containing 50 μ M AA for a day. Then cells were collected ($5-10 \times 10^6$ cells/reaction) and suspended in 0.2 mL IMDM (serum free) with or without ABCC4 inhibitors (10 μ M Ceefourin™ 1 or 50 μ M MK571). Then, 0.8 mL ice-cold PBS with 10 μ M indomethacin was added to stop PGs production and release. After that, the supernatants were harvested to quantify (A) extracellular and (B) intracellular levels of PGD₂. (C) The extracellular/intracellular ratio of the levels of PGD₂ was then calculated. Each point represents the mean \pm S.D. (n = 3). Representative results are shown. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

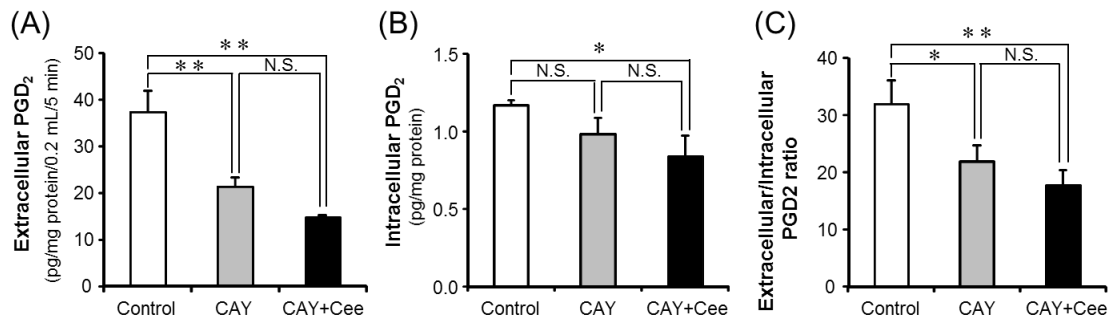


Fig. 11 Effects of an inhibitor of prostaglandin degradation enzyme in HMC-1 cells.

(A) Extracellular levels, (B) intracellular levels, and (C) extracellular/intracellular ratio of PGD₂ in HMC-1 cells treated with 50 μ M AA. HMC-1 cells were treated with culture media (IMDM with 10% FBS and 1.2 mM 1-thioglycerol) containing 50 μ M AA for a day. Then cells were collected ($5-10 \times 10^6$ cells/reaction) and suspended in 0.2 mL IMDM (serum free) with or without 50 μ M CAY10397 (CAY) or/and 10 μ M Ceefourin™ 1 (Cee). After 5 min, 0.8 mL ice-cold PBS with 10 μ M indomethacin was added to stop PGs production and release. Then the supernatants and cells were harvested to quantify extracellular and intracellular levels of PGD₂. From the quantification results, extracellular/intracellular ratio of the amounts of PGD₂ were calculated. Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Representative results are shown. Statistical analyses were performed by using Tukey's test. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, N.S.; not significant

次に RNA 干渉によって ABCC4 発現を抑制させたときの細胞外・細胞内 PGD₂ 量を測定し、ABCC4 阻害薬の結果を裏付けることとした。終濃度 30 nM の ABCC4 siRNA (HSS115675、HSS173510) を導入することにより、HMC-1 細胞の ABCC4 タンパク質発現量は約 60 %減少し、ABCC4 mRNA は約 50 - 60 %減少した (Fig.12A - C) 。また、HMC-1 細胞では COX-1 が PG 産生に機能していることが知られているが、ABCC4 siRNA 導入による COX-1 mRNA 発現量の有意な変化は見られなかった (Fig. 12D)。この条件下で、50 μM AA 24 時間曝露後の細胞外・細胞内 PGD₂ 量を測定したところ、細胞外量は 56 - 70 %、細胞内量は 23 - 29 % 有意に減少した (Fig. 12E, F)。算出した細胞外/細胞内量比は有意な減少を示し (Fig. 12G) 、ABCC4 阻害薬を使用した場合と一致したことから、ABCC4 は HMC-1 細胞からの PGD₂ 細胞外放出に寄与することを示した。

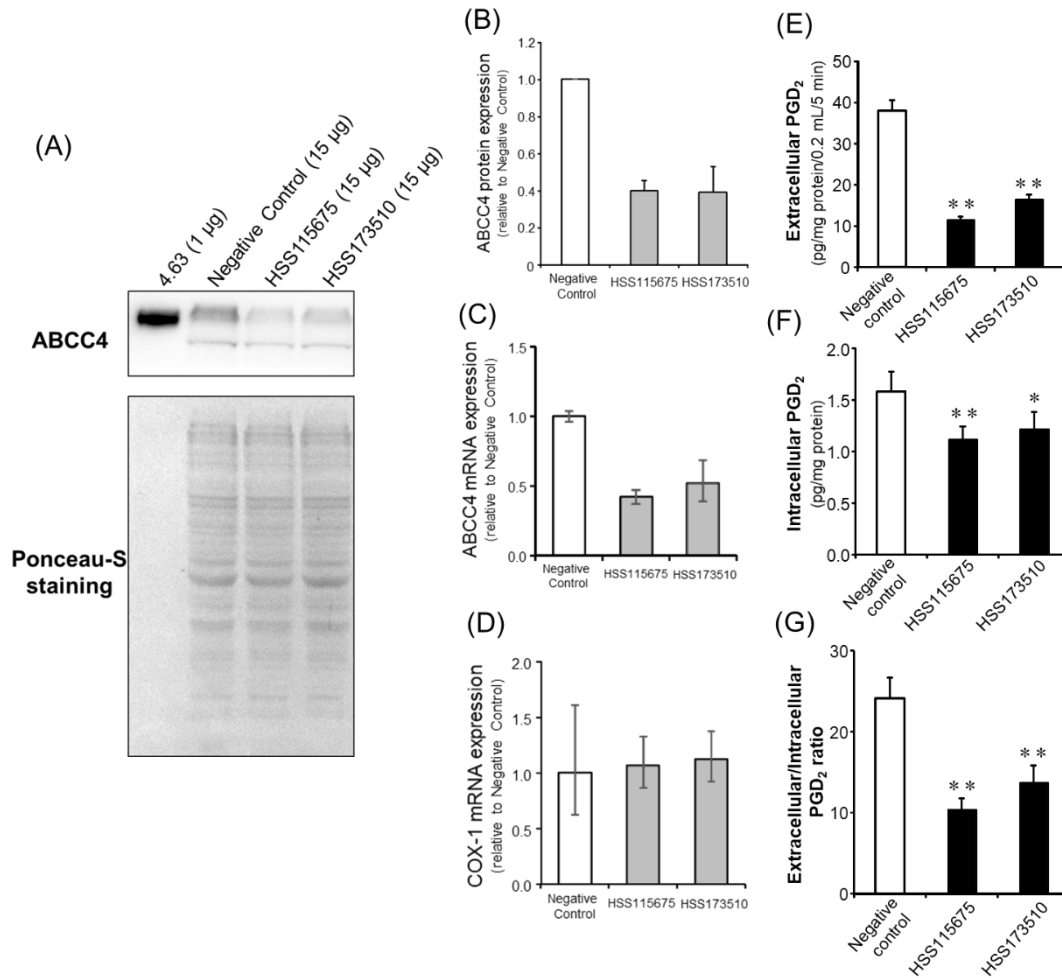


Fig. 12 Effect of ABCC4 siRNA transfection to extracellular and intracellular PGD₂ in HMC-1 cells after 50 μM AA exposure for 24 hours.

ABCC4 siRNAs (HSS115675 and HSS173510) and negative control siRNA were transfected (30 nM in final concentration) in HMC-1 cells. After 72 hours HMC-1 cells were treated with culture media containing 50 μM AA for a day. Then cells were collected ($5-10 \times 10^6$ cells/reaction) and suspended in 0.2 mL IMDM (serum free). After 5 min, 0.8 mL ice-cold PBS with 10 μM indomethacin was added to stop PGs production and release. (A, B) ABCC4 expression in HMC-1 cells. (C, D) ABCC4 and COX-1 mRNA expression in HMC-1 cells. HMC-1 cells were transfected with 30 nM Negative Control siRNA or ABCC4 siRNAs (HSS115675 and HSS173510) for 72 hours followed by 50 μM AA treatment for a day. Total RNA was then extracted from cells. Results are normalized to amplified HPRT and is presented as relative expression to negative control siRNA. Error bars indicate 95% confidence interval estimates of the mean expressions (n = 3). (E - G) Extracellular and intracellular levels of PGD₂. Extracellular/intracellular ratio of the levels of PGD₂ was calculated from the quantification results. Each column represents the mean with S.D. (n = 4). Representative results are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

第4節 抗原刺激後の肥満細胞からの PGD₂細胞外放出に対する ABCC4 阻害薬の効果

前節の結果から、ABCC4 阻害薬は HMC-1 細胞からの PGD₂細胞外放出を抑制できることを示した。肥満細胞から放出される PGD₂ は主にアレルギー性疾患の症状の発現に関わり、肥満細胞の細胞膜上に結合した IgE を介して抗原刺激を受けることで PGD₂ 産生・放出が亢進することが知られている。HMC-1 細胞は IgE 結合能を有しないことから、抗原刺激時の ABCC4 阻害効果を評価することが難しい。そこで、抗原刺激時の脱顆粒の研究に汎用されるラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 細胞^{76, 77}を用いて抗原刺激時での ABCC4 阻害効果を評価することとした。

ABCC4 mRNA (344 bp) 及びタンパク質 (160 - 170 kDa^{78, 79}) は、RBL-2H3 細胞に発現していることを確認した (Fig. 13A, B)。RBL-2H3 細胞において ABCC4 が PGD₂細胞外放出に機能していることを確認するため、10 μ M AA 共存条件下における CeefourinTM 1 による阻害効果を評価することとした。CeefourinTM 1 は 10 μ M の濃度で RBL-2H3 細胞の脱顆粒に有意に影響を及ぼしたことから、2.5 μ M の濃度で使用した。その結果、2.5 μ M CeefourinTM 1 により細胞外 PGD₂ 量は約 20 %減少した (Fig. 13C)。また、細胞内量に有意な変化はなく、結果として細胞外/細胞内量比は有意に減少した (Fig. 13D, E)。このことから、RBL-2H3 細胞においても ABCC4 が PGD₂細胞外放出に機能していることが判明した。続いて RBL-2H3 細胞を 5 分間抗原 (50 ng/mL DNP-HSA) で刺激した時の PGD₂ 放出に対する CeefourinTM 1 の効果を検証した。その結果、2.5 μ M CeefourinTM 1 存在条件下で細胞外 PGD₂ 量は約 30 %減少した (Fig. 13F)。また、細胞内量に有意な変化はなく、結果として細胞外/細胞内量比は減少傾向を示した (Fig. 13G, H)。10 μ M AA または 50 ng/mL DNP-HSA 添加後のいずれにおいても 2.5 μ M CeefourinTM 1 は細胞外 β ヘキソサミニダーゼ活性を変化させなかったことから (Fig. 13I, J)、ABCC4 阻害薬による PGD₂細胞外量の低下は、脱顆粒の抑制によって起こったものではないことが示唆された。

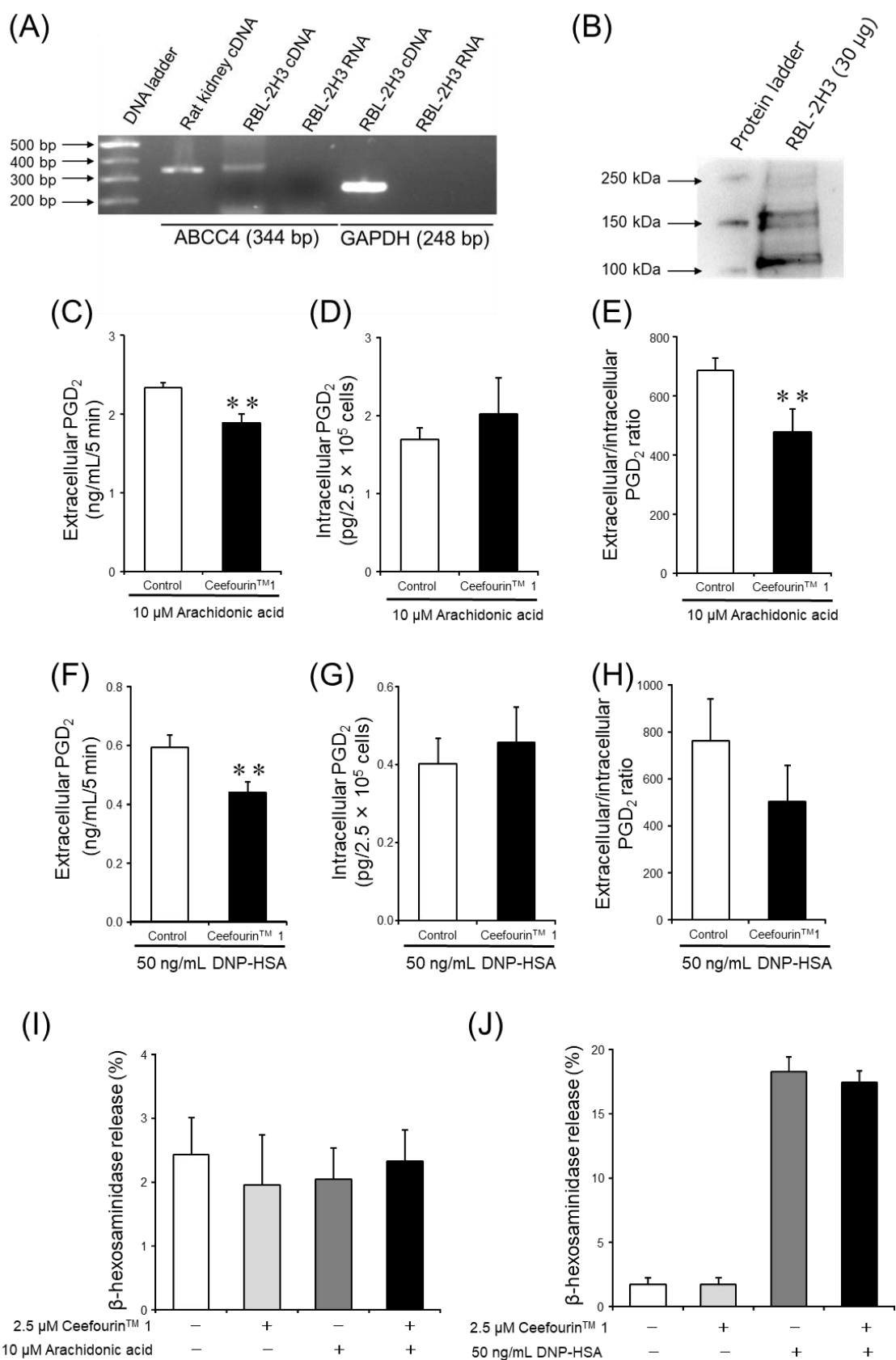


Fig. 13 Expression of ABCC4 and effect of ABCC4 inhibitor to extracellular and intracellular PGD₂ in RBL-2H3 cells.

(A) The expression of rABCC4 mRNA in RBL-2H3 cells. Complementary DNA and RNA (as a negative control) were used as templates for PCR analysis. Rat kidney cDNA was used as a positive control. (B) Expression of rABCC4 protein in RBL-2H3 cells. Rat ABCC4 protein was detected by Western blotting with monoclonal ABCC4 antibody. The other reports indicate that rABCC4 has a molecular weight of 160 - 170 kDa. (C-E) CeefourinTM 1 suppressed the PGD₂ release from RBL-2H3 cells in the presence of 10 μ M AA. RBL-2H3 cells (2.5×10^5 cells/well) were incubated in PIPES buffer with AA (10 μ M) in the presence or absence of 2.5 μ M CeefourinTM 1. Five minutes later, supernatants and cells were collected and PGD₂ was quantified. (C) Extracellular levels, (D) intracellular levels, and (E) extracellular/intracellular levels ratio of PGD₂ were shown. (F-H) The effect of CeefourinTM 1 to the PGD₂ release from RBL-2H3 cells stimulated with antigen. RBL-2H3 cells (2.5×10^5 cells/well) were sensitized with anti-DNP IgE using conditioned medium from a DNP-specific IgE-producing hybridoma. After culture for 24 hours, RBL-2H3 cells were incubated in PIPES buffer with DNP-HSA (50 ng/mL) in the presence or absence of 2.5 μ M CeefourinTM 1. Five minutes later, the supernatants and cells were collected and PGD₂ was quantified. (F) Extracellular levels, (G) intracellular levels, and (H) extracellular/intracellular levels ratio of PGD₂ were shown. (I, J) The effects of CeefourinTM 1 (2.5 μ M), arachidonic acid (10 μ M), and DNP-HSA (50 ng/mL) to the degranulation of RBL-2H3 cells. Degranulation was assessed by measuring β -hexosaminidase activity in media from RBL-2H3 cells. Each column represents the mean with S.D. (n = 4). Representative results are shown. Statistical analyses were performed by using student's t-test. **; p < 0.01.

第 5 節 ABCC4 を介した PG 輸送の基質選択性に関する検討

本章第 2 節の結果から、3-series PGs も 2-series PGs と同様に ABCC4 の輸送基質であり、2-series PG と比較し ABCC4 に対する親和性が低いことが判明した。この結果から、輸送速度論パラメーターの違いによって 2-series PGs と 3-series PGs の放出に選択性が生じる可能性を考えた。そこで、本章第 3 節で ABCC4 を阻害・ノックダウンすることにより PGD₂ 細胞外放出を抑制できることを示した HMC-1 細胞に、50 μ M AA に代え 50 μ M EPA を添加し PGD₃ 産生促進を試みた。その結果、細胞内 PGD₂、PGD₃ は 10 分まで検出下限以下であったが、細胞外 PGD₂、PGD₃ 量は経時的に増大した。(Fig. 14A, B)、ABCC4 阻害薬 (10 μ M CeefourinTM 1、50 μ M MK571) による細胞外 PGD₂、PGD₃ 量変化を検証した結果、細胞外 PGD₂ 量はそれぞれ 36%、43% 有意に減少した。また細胞外 PGD₃ 量は、有意差はないもののそれぞれ 17%、23% の減少傾向を示した (Fig. 14C, D)。

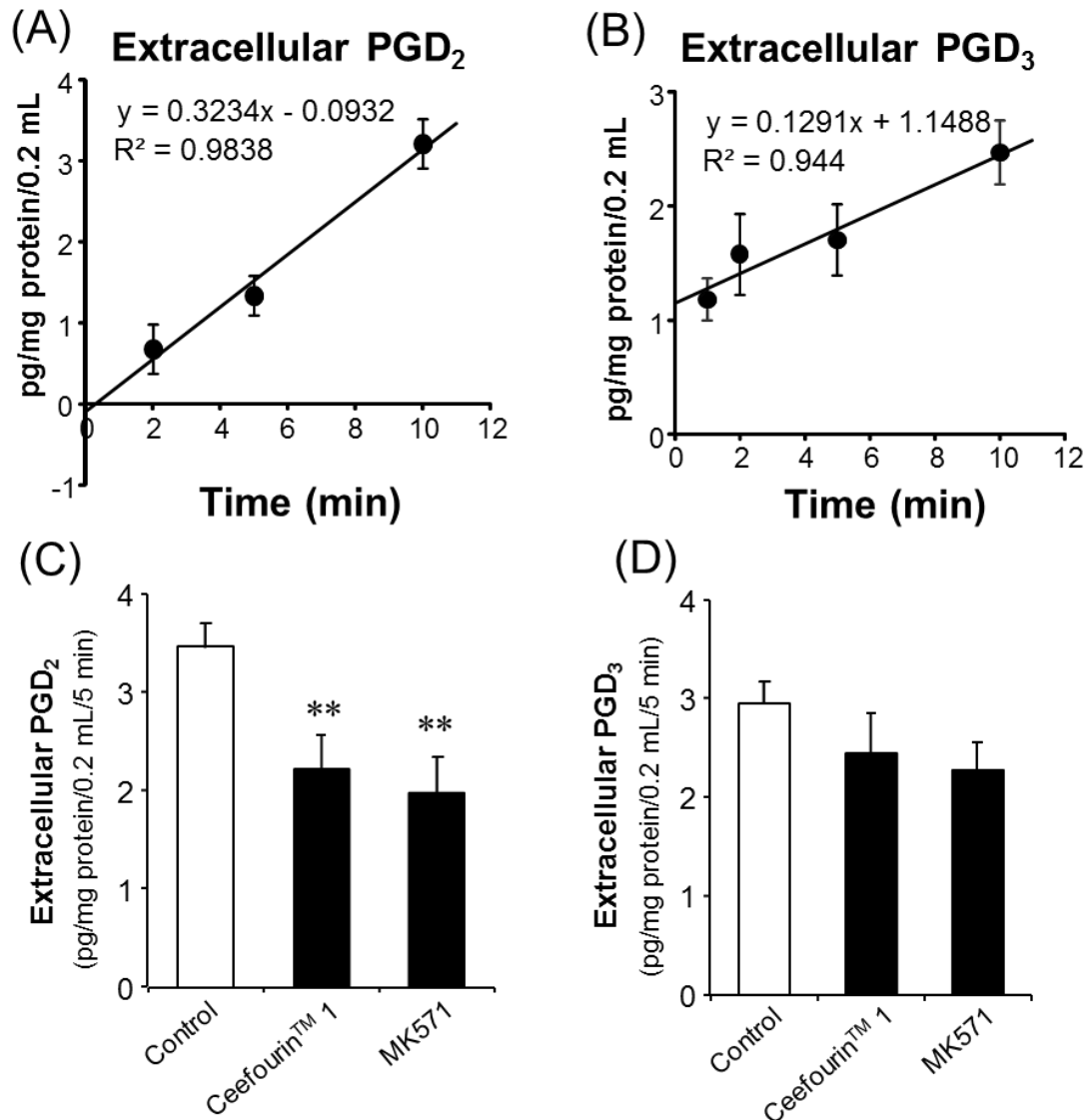


Fig. 14 Extracellular levels of PGD₂ and PGD₃ in HMC-1 cells after 50 μ M EPA exposure for 24 hours.

HMC-1 cells were treated with culture media (IMDM with 10% FBS and 1.2 mM 1-thioglycerol) containing 50 μ M EPA for a day. Then cells were collected ($5-10 \times 10^6$ cells/reaction) and suspended in 0.2 mL IMDM (serum free). Then, 0.8 mL ice-cold PBS with 10 μ M indomethacin was added to stop PGs production and release. After that, the supernatants were harvested to quantify extracellular levels of PGD₂ and PGD₃. (A, B) Time-dependent alteration of extracellular levels of (A) PGD₂ and (B) PGD₃ in HMC-1 cells treated with 50 μ M EPA. (C, D) Inhibitory effect of 10 μ M CeefourinTM 1 to PGD₂ release from HMC-1 cells treated with 50 μ M EPA for 5 min. Extracellular levels of (C) PGD₂ and (D) PGD₃ were quantified. Each point represents the mean \pm S.D. (n = 3). Representative results are shown. **, $p < 0.01$

続いて ABCC4 阻害薬による細胞内外 PGE₃、PGF_{3α} 量の変動を調べることにした。A549 細胞は PGE₂、PGF_{2α} の細胞外放出に ABCC4 が機能することが既知であり⁴¹、また EPA を含む培地で培養することにより PGE₃ を産生することから⁴⁶、本実験に適した細胞株であると考えた。A549 細胞を 100 μM EPA を含む培地（血清不含）で 24 時間培養した後、カルシウムイオノフォア A23187 (10 μM) で 5 分間刺激することによって、検出に十分な量の PGE₃、PGF_{3α} が産生された。この条件で 50 μM MK571 を添加した結果、細胞外 PGE₃、PGE₂ 量はそれぞれ 27 % の減少傾向、47 % の有意な減少を示した (Fig. 15A, B)。また、同様に細胞外 PGF_{3α}、PGF_{2α} 量もそれぞれ 33 %、37 % 減少した (Fig. 16A, B)。この時の細胞内量は PGE₃、PGE₂ でそれぞれ 41 % の増加傾向、62 % の有意な増加を示したが (Fig. 15C, D)、一方で PGF_{3α}、PGF_{2α} は変化しなかった (Fig. 16C, D)。以上の結果から算出した細胞外/細胞内量比はいずれも有意な減少を示し (Fig. 15E, F, Fig. 16E, F)、MK571 による細胞外放出抑制が示された。

ABCC4 ノックダウンによっても細胞外量の減少が起こることを確認するため、A549 細胞に ABCC4 siRNA（終濃度 1 nM、HSS115675 及び HSS173510）を導入したところ、導入後 72 時間で ABCC4 発現の顕著な抑制が確認された (Fig. 17A)。また、この時の COX-2 発現量は HSS115675 で減少傾向、HSS173510 で増加傾向を示した (Fig. 17B)。PGE₃、PGE₂、PGF_{3α}、PGF_{2α} のいずれも、Negative control と比較して 46 - 72 % の有意な細胞外量の減少が見られた (Fig. 17C, D, Fig. 18A, B)。一方、PGE₃、PGE₂ 細胞内量は変化がないか、または有意な増加を示したが (Fig. 17E, F)、PGF_{3α}、PGF_{2α} 細胞内量はそれぞれ 37 - 42 %、52 - 56 % 有意に減少した (Fig. 18C, D)。この結果から算出した細胞外/細胞内量比は、Negative control と比較していずれの PG も有意な減少を示した (Fig. 17G, H, Fig. 18E, F)。

以上の結果を元に、MK571 及び ABCC4 siRNA を使用した場合の細胞外 PGE₂/PGE₃ 比、PGF_{2α}/PGF_{3α} 比を算出した。細胞外 PGE₂/PGE₃ 比は MK571 により 3.4 から 2.7 へ (Fig. 19A)、ABCC4 siRNA により 3.8 から 2.9 - 3.2 へ有意に減少した (Fig. 19B)。また、細胞外 PGF_{2α}/PGF_{3α} 比は MK571 で変化しなかったが (Fig. 19C)、ABCC4 siRNA により 6.7 から 4.4 - 5.3 へ有意に減少した (Fig. 19D)。

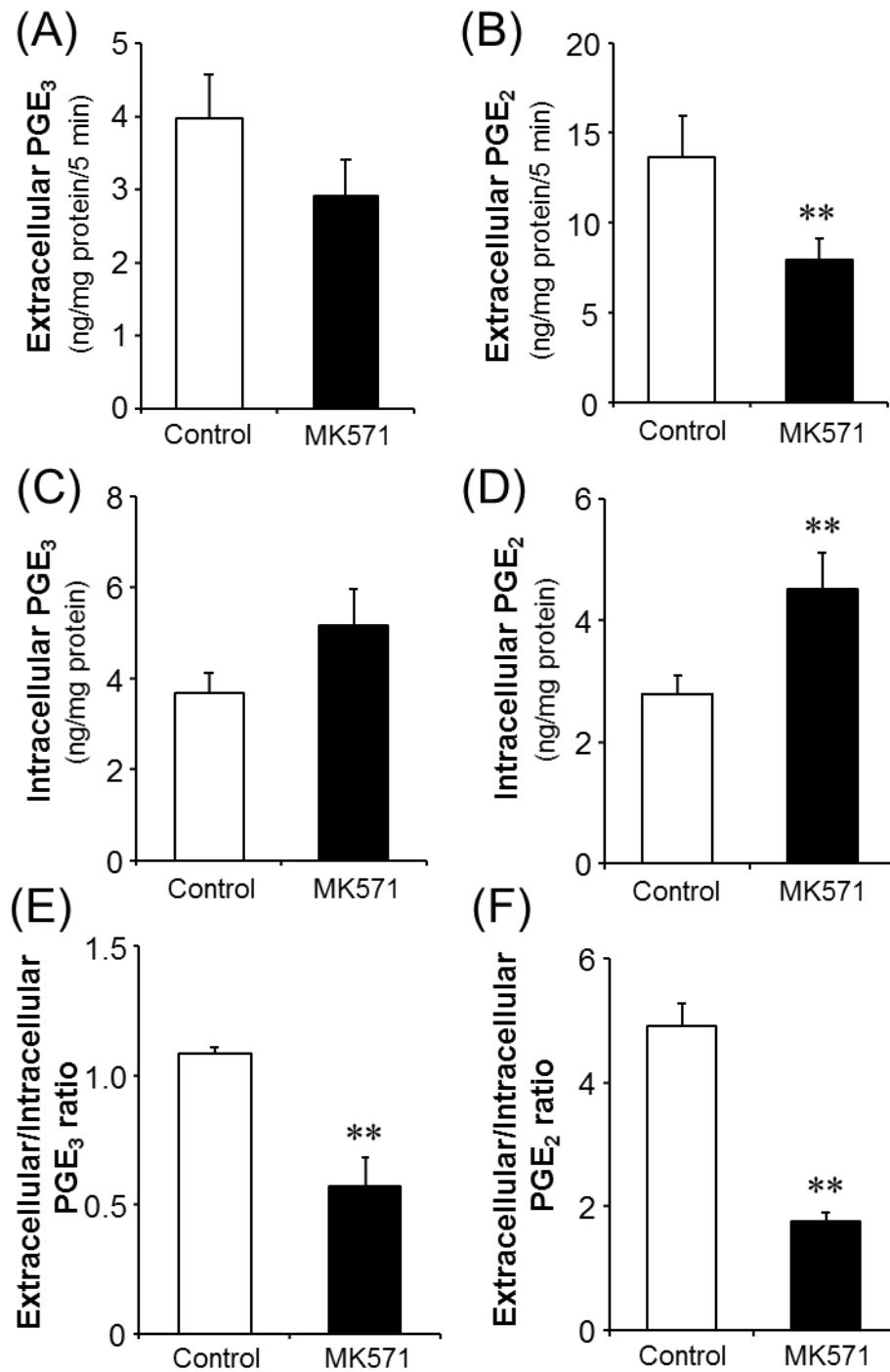


Fig. 15 Effect of ABCC4 inhibitor to extracellular and intracellular PGE₃ and PGE₂ in A549 cells after 100 μM EPA exposure for 24 hours.

A549 cells were treated with DMEM containing 100 μM EPA for a day. Then cells were washed with PBS (-) and treated with 10 μM A23187 and ABCC4 inhibitor (50 μM MK571) in DMEM for 5 min. The media and cells were collected to quantify (A, B) extracellular and (C, D) intracellular PGE₃ and PGE₂. Extracellular/Intracellular ratios of (E) PGE₃ and (F) PGE₂ were then calculated. Each column represents the mean ± S.D. (n = 3). Representative results are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

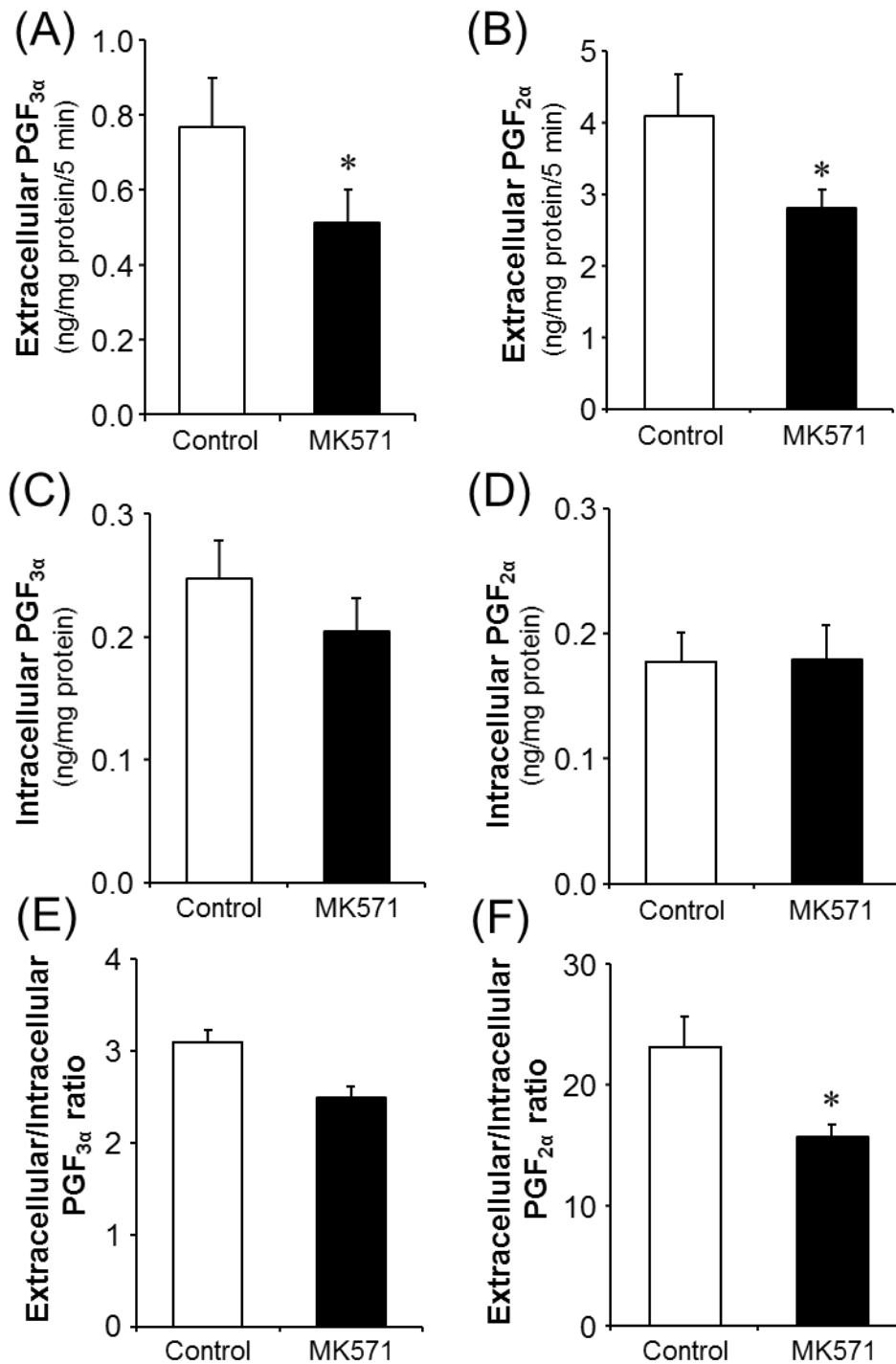


Fig. 16 Effect of ABCC4 inhibitor to extracellular and intracellular PGF_{3α} and PGF_{2α} in A549 cells after 100 μM EPA exposure for 24 hours.

A549 cells were treated with DMEM containing 100 μM EPA for a day. Then cells were washed with PBS (-) and treated with 10 μM A23187 and ABCC4 inhibitor (50 μM MK571) in DMEM for 5 min. The media and cells were collected to quantify (A, B) extracellular and (C, D) intracellular PGF_{3α} and PGF_{2α}. Extracellular/Intracellular ratios of (E) PGF_{3α} and (F) PGF_{2α} were then calculated. Each column represents the mean ± S.D. (n = 3). Representative results are shown. *, *p* < 0.05

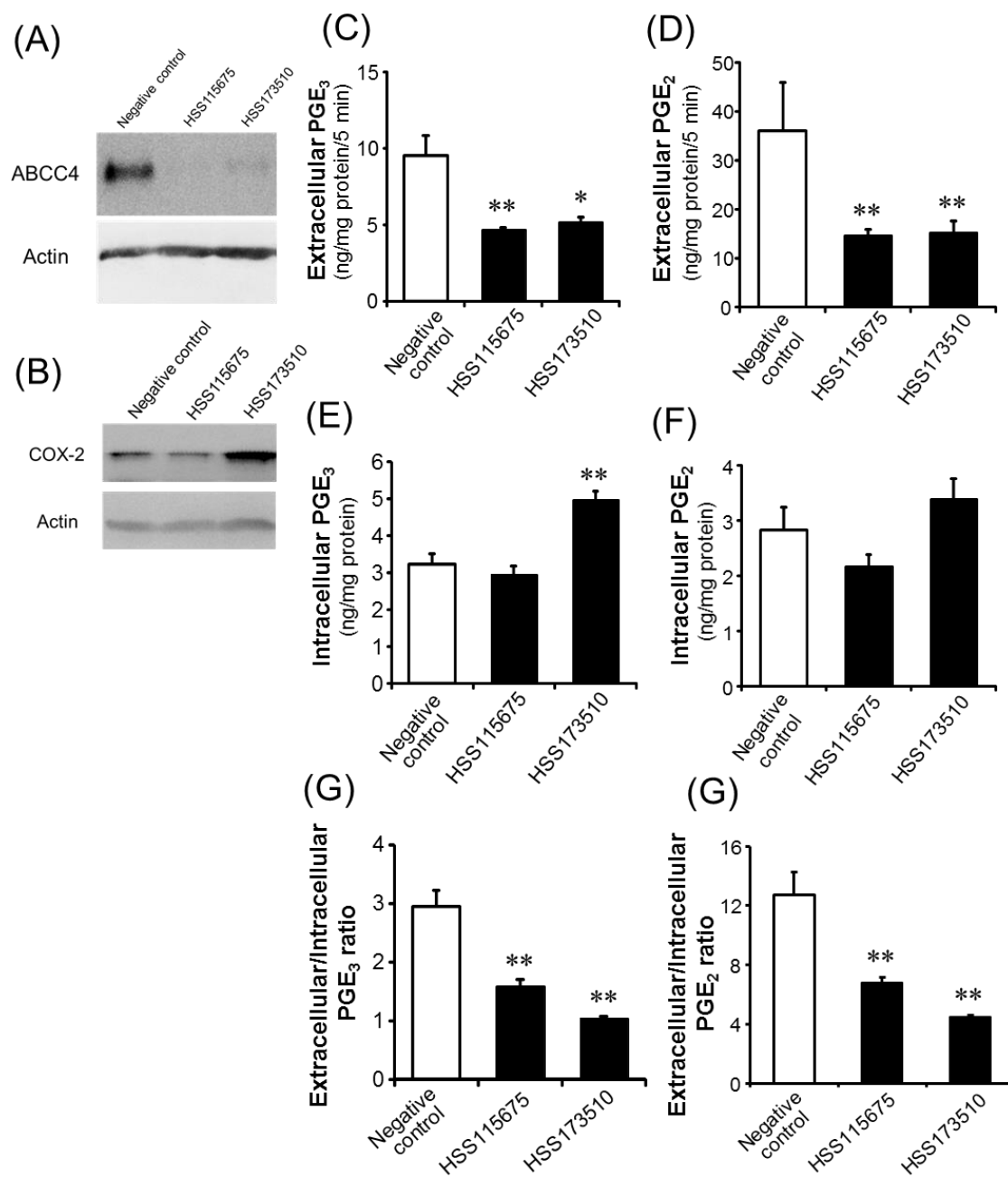


Fig.17 Effect of ABCC4 siRNA transfection to extracellular and intracellular PGE₃ and PGE₂ in A549 cells.

ABCC4 siRNAs (HSS115675 and HSS173510) and negative control siRNA were transfected in A549 cells for 72 h. The A549 cells were then treated with 100 μ M EPA for 24 h followed by 10 μ M A23187 for 5 min. (A, B) ABCC4 and COX-2 expression in A549 cells. (C, D) The extracellular levels of PGE₃, and PGE₂ were measured. (E, F) The intracellular levels of PGE₃, and PGE₂ were measured. (G, H) The ratio of extracellular to intracellular levels of PGE₃ and PGE₂ were calculated. Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Representative experiments are shown. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

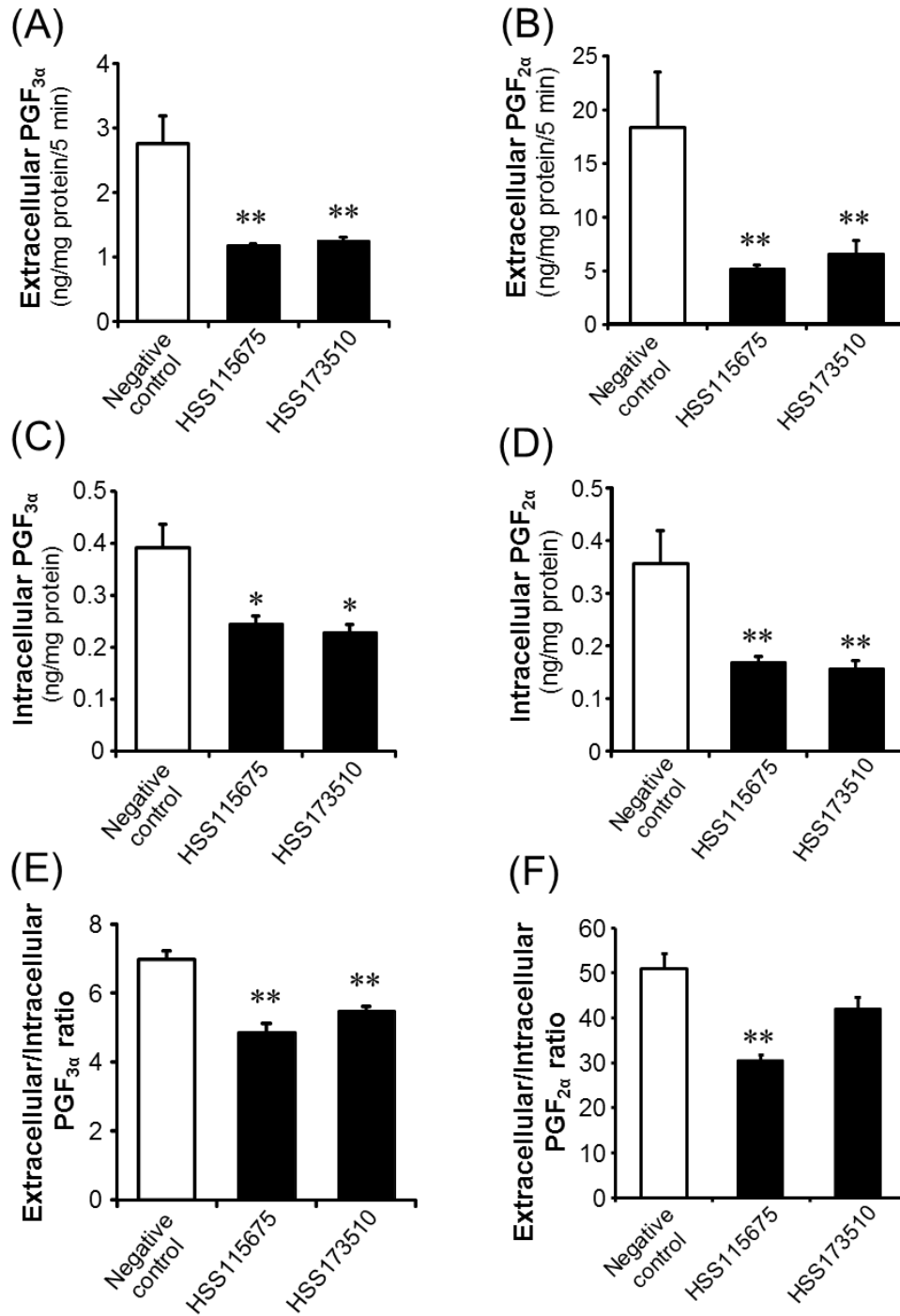


Fig. 18 Effect of ABCC4 siRNA transfection to extracellular and intracellular PGF_{3α} and PGF_{2α} in A549 cells.

ABCC4 siRNAs (HSS115675 and HSS173510) and negative control siRNA were transfected in A549 cells for 72 h. The A549 cells were then treated with 100 μM EPA for 24 h followed by 10 μM A23187 for 5 min. (A - D) The extracellular and intracellular levels of (A, C) PGF_{3α}, and (B, D) PGF_{2α} were measured. (E, F) The ratio of extracellular to intracellular levels of (E) PGF_{3α} and (F) PGF_{2α} were calculated. Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Representative experiments are shown. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

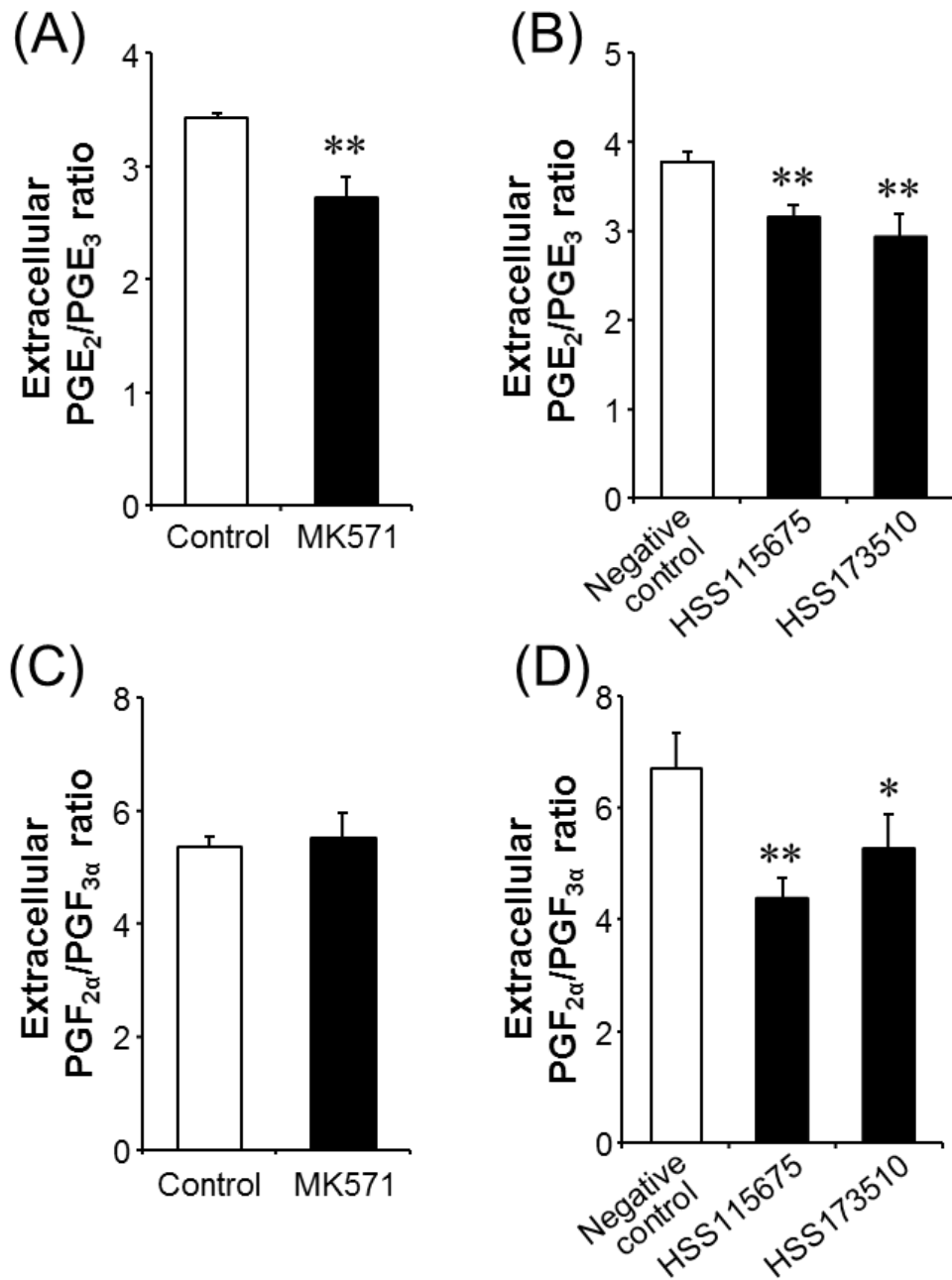


Fig. 19 Effect of ABCC4 inhibitor or ABCC4 siRNA transfection to the ratio of extracellular 2-series PGs/3-series PGs in A549 cells.

Extracellular PGE₂/PGE₃ (A, B) or PGF_{2α}/PGF_{3α} (C, D) ratios were calculated from the data described in Figs. 15 - 18. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

第6節 考察

本章ではまず、AA から生合成される 2-series PG の中で比較的安定な PGD₂、PGE₂、PGF_{2α} に加え、2-series PGs と同様の生合成経路で EPA から生合成される 3-series PG (PGD₃、PGE₃、PGF_{3α}) に着目し、輸送特性解析を行った。ABCC4 過剰発現 HEK293 細胞から作製した膜小胞を用いることで、PGD₂、PGD₃、PGE₃、PGF_{3α} が ABCC4 の輸送基質であることを明らかにした (Table 5)。ABCC4 の典型的基質・阻害薬を用いた阻害実験でプロベネシド、cGMP は既報の IC₅₀、K_m の 5 倍程度の高濃度存在条件下でも阻害効果は小さかった。cGMP は同じく ABCC4 の輸送基質であるメトトレキサートの輸送を非競合的に阻害することが知られている⁸⁰。また、ABCC4 によるメトトレキサートの輸送を阻害する尿酸は、cGMP 輸送を阻害しないことがわかっていることから⁵⁸、メトトレキサートと cGMP は異なる基質結合部位を介して ABCC4 により輸送されている可能性が高い。メトトレキサートの類似化合物である葉酸 (K_m = 170 μM) が K_m に近い 200 μM で PG 輸送を 32 - 59 % まで抑制したことから (Table 6)、PG はメトトレキサートや葉酸と同じ基質結合部位に結合し、cGMP とは異なる可能性が考えられる。加えて、プロベネシドの IC₅₀ は cGMP 輸送に対する阻害実験から得られた結果である⁷⁸。以上より、プロベネシドや cGMP は PG と異なる結合部位に結合するため、今回の阻害効果と既報の IC₅₀ や K_m との乖離が生じたと考え、PGD₂、PGD₃、PGE₃、PGF_{3α} が ABCC4 の輸送基質であることを否定する結果になり得ないとする。

ABCC4 を介した輸送速度の濃度依存性実験から算出された K_m が、PGD₂ < PGE₂ < PGD₃ < PGE₃ < PGF_{2α} < PGF_{3α} であることが判明した (Table 5)。2-series PG に着目すると、PGF_{2α} の 9 位 (PGE₂) または 11 位 (PGD₂) いずれかのヒドロキシ基がカルボニル基へ変換されると ABCC4 への親和性が高まることがわかる。これにより ABCC4 との相互作用がどのように変化する親和性に影響しているか証明されていないが、考えられる可能性として PGF_{2α} の 9、11 位のヒドロキシ基が五員環の同じ面に向いており、その面が親水的であると考えられる (Fig. 20)。これが ABCC4 の疎水性残基との相互作用を妨げているため、PGE₂ や PGD₂

に比べ親和性が低下したと推察される。

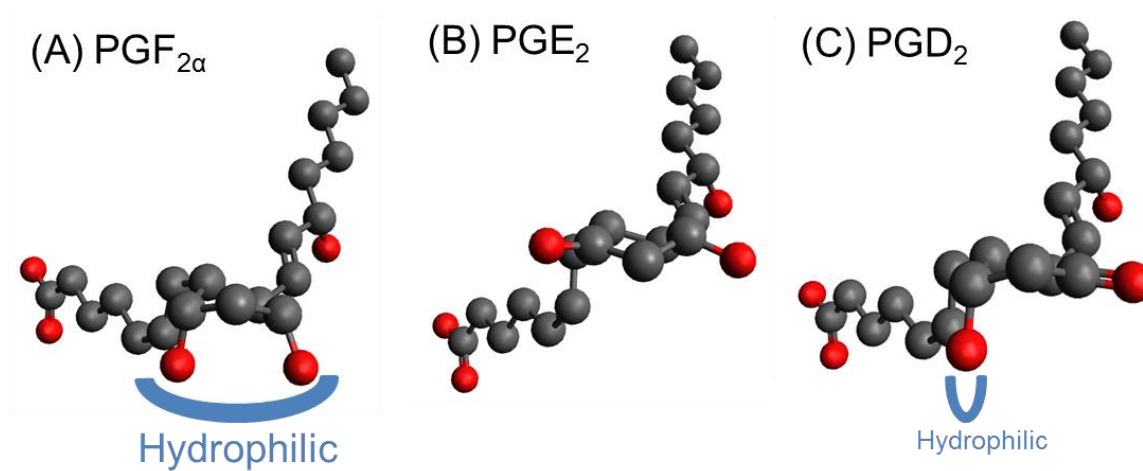


Fig. 20 3D structures of $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 , and PGD_2 .

Black and red spheres mean carbon atom and oxygen atom, respectively. Hydrogen atoms were removed in these structures. These structures were made by Avogadro 2.0.8.0.

PGD₂ は ABCC4 に対する親和性が PGE₂ と同程度に高い輸送基質であった。PGE₂ の細胞外放出及び作用発現（痛覚閾値の低下）が ABCC4 ノックアウトマウスで抑制された報告から⁴⁰、同様に PGD₂ の細胞外放出及び作用発現に ABCC4 が寄与する可能性を考えた。特に ABCC4 を介した PGD₂ 細胞外放出が特定の細胞で起こる可能性を考えたことから、PGD₂ 産生細胞株として知られる 2 種類の細胞株（TE671 細胞と HMC-1 細胞）を用いて検討を行った。その結果、ABCC4 は HMC-1 細胞、TE671 細胞のいずれにおいても発現するが、ABCC4 選択的阻害薬によって TE671 細胞の PGD₂ 細胞外量は変化しない一方で、HMC-1 細胞の PGD₂ 細胞外量が低下した（Fig. 8A - C, Fig. 10A）。さらに RBL-2H3 細胞にも ABCC4 が発現し、抗原刺激後も ABCC4 阻害薬によって PGD₂ 細胞外量を低下させることがわかった（Fig. 13）。また、PGD₂ 細胞外量の減少は脱顆粒の抑制によって起こったのではないことが示唆されたことから、肥満細胞からの PGD₂ 放出において脱顆粒とは独立して ABCC4 が寄与する可能性を本研究では初めて見出した。HMC-1 細胞に比べ RBL-2H3 細胞で ABCC4 阻害薬による細胞外 PGD₂ 量低下が小さかった理由として、ABCC4 発現量の違いが考えられる。両細胞間での ABCC4 発現量を直接比較可能なデータは存在しないが、RBL-2H3 細胞の ABCC4 mRNA 及びタンパク質のシグナルが小さく HMC-1 細胞の場合より検出が困難であったことから、RBL-2H3 細胞での ABCC4 発現量は低いと考えられる。肥満細胞において ABCC4 が PGD₂ 細胞外放出に関わることの生理的意義については今後さらなる検討が必要であるが、がん組織に浸潤した肥満細胞からのメディエーター分泌は抗原刺激時の脱顆粒とは異なると考えられている⁸¹。がん組織で肥満細胞が造血器型 PGD 合成酵素（H-PGDS）を介して産生し放出した PGD₂ は血管新生抑制作用を示すことが知られており^{82, 83}、この PGD₂ 放出を担う分子の一つが ABCC4 である可能性が考えられる。

TE671 細胞では ABCC4 が発現するにもかかわらず PGD₂ 細胞外放出に寄与せず、この原因は現在のところ不明である。一方で、エキソサイトーシスを阻害することにより PGD₂ 細胞外放出を抑制できることを明らかにした（Fig. 9）。TE671 細胞で機能することが報告されているリボカリン型 PGD 合成酵素（L-PGDS）は、中枢組織において PGD₂ 生合成の主要な

酵素であると知られている⁸⁴。L-PGDS は細胞内の小胞体内に局在し、PGD₂とともに脳脊髄液中へ分泌されることから^{84,85}、L-PGDS を介して生合成された PGD₂はエキソサイトシスにより脳内細胞中の小胞体から直接細胞外の脳脊髄液中へ放出されていることは妥当な結果であると考ええる。この結果から、L-PGDS が主に機能する中枢組織では PGD₂細胞外放出に ABCC4 が利用されていないと推察される。一方、ABCC4 は脈絡膜に発現することから、PGD₂を脳脊髄液中から全身血中へ排出することで PGD₂生理作用の調節を担っていると考えられており⁸⁶、ABCC4 ノックアウトマウスを用いた睡眠覚醒パターンの解析により検証することが今後必要であると考ええる。

膜小胞を用いた速度論解析から、3-series PG の ABCC4 に対する親和性が 2-series PG よりも低いことが示された (Table 5)。これは PGT や受容体に対する結果と類似する^{43,87}。3-series PG の ω-3 位に存在する二重結合が親和性の低下の要因であると考えられ、COX と AA、EPA との結合の報告から、この二重結合が自由度を減少させることで 3-series PG と ABCC4 の結合が弱まったものと推察される^{88,89}。その結果、2-series PG と 3-series PG で K_m は 1.8 - 3.6 倍変化したが、一方で輸送効率を示す V_{max}/K_m は 1.2 - 1.9 倍の違いにとどまった。これには ABCC4 の ATP 加水分解活性部位を形成するアミノ酸残基の配置が結合する PG によって変化し、結果として V_{max} が変化した可能性が考えられる。PGE₂ の結合により ABCC4 の ATP 加水分解活性が上昇することが知られており⁹⁰、これは LTC₄ の結合により ABCC1 の 2 つの ATP 結合カセットが近接し ATP 加水分解活性が高まることと同様のメカニズムであると推測される⁹¹。すなわち、ABCC4 に結合した時に ATP 加水分解し易いように構造変化を起こす PG ほど V_{max} が高まり輸送効率が上昇する可能性が考えられる。以上の速度論解析の結果から、細胞内濃度が K_m に近づくと 2-series PG と 3-series PG の競合が生じ、ABCC4 に対する親和性の高い 2-series PG が優位に輸送されることが考えられる。一方で細胞内濃度が K_m を下回る場合、2-series PG と 3-series PG の V_{max}/K_m が同等であることから、細胞外放出における ABCC4 の寄与も同程度になると予想される。

50 μM EPA で 24 時間処理した HMC-1 細胞の PGD₃細胞外量は、10 μM CeefourinTM 1、50

μ M MK571 でそれぞれ 17 %、23 %減少傾向を示したものの、PGD₂ 細胞外量の減少 (36 %、43 %) よりは小さかった (Fig. 14C, D)。しかし、細胞外 PGD₂、PGD₃ 量の経時変化の結果得られた近似直線の y 軸切片 (Fig. 14A, B) から、0 分の推定細胞外 PGD₂、PGD₃ 量はそれぞれ 0.09、1.15 pg/mg protein/0.2 mL となり、細胞外 PGD₃ 量のベースラインが高いと推測される。こうした現象が起こる原因は現在のところ不明である。この結果、0 分での推定細胞外量をそれぞれ差し引いて CeefourinTM 1、MK571 による細胞外量の減少率を算出した結果、PGD₂ は 35 %、42 %、PGD₃ は 28 %、38 %の減少を示すことがわかり、2 つの ABCC4 阻害薬の効果はほぼ同等であると考えられた。この時の HMC-1 細胞内 PGD₂、PGD₃ 量は検出下限以下であり、HMC-1 細胞の細胞容積は報告されていないが、HeLa 細胞の細胞質容積が 1.6 pL/cell である報告を参考として適用した場合⁹²、細胞内濃度は 1 nM 以下と K_m を大きく下回ることが推定され、互いに競合しているとは考えにくい。また、ABCC4 を介した PGD₂ と PGD₃ 輸送の輸送効率はそれぞれ 3.0、3.6 μ L/mg protein/30 sec (Table 5) とほぼ同等であることから、ABCC4 阻害薬の効果は同等であったことは妥当な結果と考えられる。一方で ABCC4 阻害薬によって HMC-1 細胞外 PGD₂ 量は 1.3 - 1.5 pg/mg protein/5 min 減少したのに対し、細胞外 PGD₃ の減少量は 0.5 - 0.7 pg/mg protein/5 min であり、PGD₂ の約 0.4 倍であることが判明した。これは PGD₂ と PGD₃ の生合成速度の差が反映されている可能性がある。H-PGDS による PGD₃ 生合成速度は PGD₂ の 0.2 倍であると報告されており³⁶、本結果を説明できるものと考えられる。

A549 細胞からの PGE₃、PGF_{3 α} 放出は PGE₂、PGF_{2 α} と同様、ABCC4 阻害薬及び ABCC4 ノックダウンによって抑制されることを示した (Figs. 15 - 18)。PGE₂/PGE₃ 細胞外量比は ABCC4 阻害、ABCC4 ノックダウンいずれによっても減少したことから (Fig. 19A, B)、PGE₃ に比べ PGE₂ の方が細胞外放出における ABCC4 の寄与が大きいと考えられる。PGE₂、PGE₃ が細胞内に均一に存在すると仮定し、過去にスルファニラミドを用いた結果から A549 細胞内容積が 2.1 μ L/mg protein であったことを適用すると、PGE₂、PGE₃ の細胞内濃度はそれぞれ 3.8、4.4 μ M と算出される。PGE₂、PGE₃ の生合成に関わる mPGES-1 は核膜に存在するこ

とから⁹³、実際には細胞内に均一に存在せず細胞膜近傍では算出された濃度に達しないと推測されるが、 K_m に近い数値になる可能性がある。この結果、 PGE_2 と PGE_3 が競合し、ABCC4に対する親和性の高い PGE_2 が優先的に輸送されたと考えられる。一方で $PGF_{2\alpha}/PGF_{3\alpha}$ 細胞外量比はABCC4阻害によって変化しなかった (Fig. 19C)。 $PGF_{2\alpha}$ 、 $PGF_{3\alpha}$ の推定細胞内濃度はそれぞれ0.48、0.53 μM と、ABCC4による輸送の K_m の1/10以下であり競合する可能性が低いことから、HMC-1細胞の PGD_2 、 PGD_3 と同様に妥当な結果であると考えられる。ABCC4ノックダウンによって $PGF_{2\alpha}/PGF_{3\alpha}$ 細胞外量比は減少したが (Fig. 19D)、ABCC4阻害の結果を考慮すると、ABCC4ではなくABCC4ノックダウンに付随して変化した生合成過程の影響によるものと考えられる。 PGF 合成能を有するAldo-keto reductase 1B1 (AKR1B1)やAKR1C3は、 PGH_2 に対する K_m がそれぞれ1.9 μM 、10 μM であり⁹⁴、mPGES-1 ($K_m=160$ μM)に比べ低いことが知られている⁹⁵。このことから、AKR1B1やAKR1C3で PGH_2 と PGH_3 が競合した結果を反映したのではないかと推察される。以上のことから、 PG の細胞内濃度がトランスポーターによる輸送の K_m を下回る条件であれば、トランスポーター阻害によって2-series PG /3-series PG 細胞外量比が変化する可能性は低いと考えられる。

ABCC4阻害やノックダウンにより細胞外放出が抑制されることで細胞内に PG が蓄積すると考えられたが、予想に反しほとんどの PG は細胞内で蓄積しなかった。この原因としてまず代謝や変換の影響を考えたが、HMC-1細胞では PG 代謝に関わる15-PGDHを阻害しても細胞内 PGD_2 の蓄積は見られず (Fig. 11)、また PGD_2 はPGFS-2を介して $PGF_{2\alpha}$ に変換されることが知られているものの⁹⁵、control群、ABCC4阻害薬群のいずれでも細胞内 $PGF_{2\alpha}$ は検出されなかった。本検討では測定対象外であった他の PG 代謝物へ変換された可能性は現在のところ否定できず、細胞内 PG 代謝物の網羅的な測定を要すると考えられる。

別の原因としては生合成の低下が挙げられる。MK571によるTE671細胞内 PGD_2 量の低下は、HMC-1細胞・A549細胞の TXB_2 と同様の傾向を示した。MK571はCOX-2の酵素活性には影響しないことを確認しており⁴¹、少なくともその下流のL-PGDSやTXSに影響を及ぼしていると考えられる。L-PGDSとTXSは他の PG 合成酵素と異なりシステイン残基

が活性中心となっている⁹⁵。また、MK571 とほぼ同じ化学構造を有する MK0679 はグルタチオン抱合を受けることが知られている⁹⁶。このことから、恐らく MK571 は L-PGDS や TXS の活性中心の活性化した硫黄原子と結合し酵素活性を消失させる自殺基質として影響を及ぼした可能性が考えられる。一方で、ABCC4 阻害薬使用後の HMC-1 細胞の PGD₂、A549 細胞の PGF_{2α}・PGF_{3α}においても生合成低下の可能性が考えられるが、現在のところ詳細は不明である。1つの可能性として一時的に蓄積した細胞内 PG が合成酵素をフィードバック阻害したことが考えられる。この場合、今回の研究では検討しなかった ABCC4 阻害薬存在下での経時的な細胞外・細胞内 PG 量変動の解析により、5分よりも短時間で細胞内量の増加が見られると考えられ、今後の検討課題である。

一方、ノックダウンのように ABCC4 を長期的に抑制した場合、ABCC4 による cAMP 排出低下と PG 放出低下の2つの要因により合成酵素発現低下が生じる可能性がある。ABCC4 は cAMP を輸送基質とすることから ABCC4 ノックアウトマウスでは細胞内 cAMP 濃度が常に高い状態にあり、外部刺激に応じたシグナル伝達に対応できないことが報告されている⁴⁰。COX-2 の発現誘導を引き起こす経路の一つに cAMP-protein kinase A (PKA) 経路があることから、ABCC4 ノックアウトマウスにおける COX-2 発現量低下は cAMP-PKA シグナルの減弱の結果であると考えられている⁴⁰。しかしながら、本検討で ABCC4 siRNA 導入により A549 細胞の COX-2 タンパク質発現量が、一方の siRNA で低下し他方で上昇した (Fig. 17B)。この結果から A549 細胞の COX-2 発現変動は ABCC4 発現抑制に由来する cAMP-PKA シグナル減弱の影響によるものでないと考えられる。一方 AKR1C3 は forskolin により発現誘導されること⁹⁷、H-PGDS はプロモーター部位に cAMP response element を有することが報告されている⁹⁸。このことから、ABCC4 siRNA 導入による A549 細胞での PGF_{2α}・PGF_{3α}、HMC-1 細胞での PGD₂ の細胞外・細胞内量低下は、cAMP シグナル減弱に伴う AKR1C3、H-PGDS 発現低下が原因であると推察される。

また、PGE₂ は EP2 を介して COX-2 発現を上昇させることが報告されている⁴⁵。COX-2 発現上昇により mPGES-1 発現も上昇する報告もあり⁹⁹、こうしたポジティブフィードバック

機構が PGE₂ 放出低下により減弱した可能性も考えられる。この可能性は ABCC4 のみならず PG 細胞外放出を標的とした場合には常に起こりうることから、今後検証する必要があると考える。特に PGE₂ 以外に同様のポジティブフィードバック機構を示すか否かは解明されていないことから、PGE₂ と同様に PGD₂ や PGF_{2α} を細胞株に添加した際の合成酵素発現変動解析に今後着手すべきと考える。

以下に本章で明らかとなったことをまとめる (Fig. 21)。

- ・ ABCC4 阻害効果の細胞選択性 : ABCC4 を発現する PGD₂ 産生細胞である 2 種類の培養細胞 (ヒト小脳髄芽細胞由来 TE671 細胞とヒト肥満細胞由来 HMC-1 細胞) を使用した結果、ABCC4 阻害薬は HMC-1 細胞からの PGD₂ 放出を抑制し、TE671 細胞からの PGD₂ 放出を抑制しなかった。TE671 細胞では PGD₂ 細胞外放出においてエキソサイトシスの寄与が大きいことがわかり、PG 細胞外放出における ABCC4 の寄与が大きい細胞に対して選択的に ABCC4 阻害薬が効果を示す可能性を示した。

- ・ ABCC4 阻害による PG バランスの変化 : AA から生合成される PGE₂、PGF_{2α} と EPA から生合成される PGE₃、PGF_{3α} の細胞外量比が、ABCC4 阻害薬によって変化するか検証した結果、PGE₂/PGE₃ 比は減少したが、PGF_{2α}/PGF_{3α} は変化しなかった。輸送の速度論パラメーターと推定細胞内濃度の関係から、PGE₂ と PGE₃ は ABCC4 を介した輸送において競合し、より親和性の高い PGE₂ が優先的に輸送されていたと考えられる。一方で PGF_{2α} と PGF_{3α} は ABCC4 を介した輸送において競合しないため、同程度に輸送されたと考えられた。このことから、PG 細胞内濃度が ABCC4 を介した輸送の K_m を下回る場合には、ABCC4 阻害による PG バランス変化は起こらない可能性を示した。

以上のことから、ABCC4 を標的とした治療戦略が有用である可能性を示した。しかしながら、ABCC4 を阻害しても細胞外 PG 量は最大でも 50% 程度の減少に留まり、ABCC4 阻害薬が効果不十分となることが懸念された。このことから、ABCC4 に代わる新たな治療標的となる PG 細胞外放出トランスポーターを探索する必要があると考え、次章でその輸送特性の解析を行うこととした。

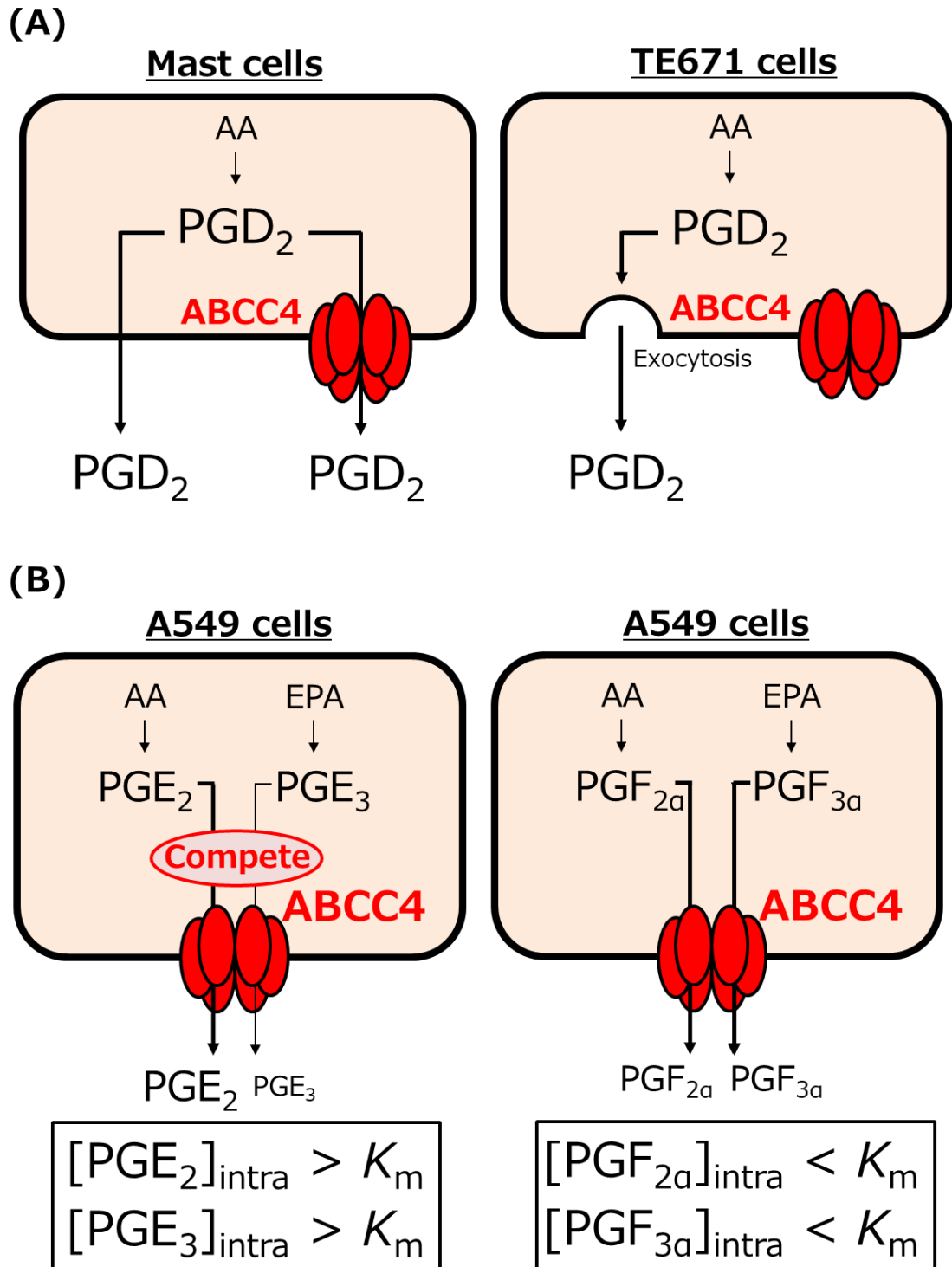


Fig. 21 Summary of the results in Section 1.

(A) ABCC4 contributed to the release of PGD_2 in mast cells. These results suggested that inhibition of ABCC4 could suppress the release of PG from the certain types of cells in which ABCC4 functions as a PG exporter.

(B) The extracellular levels ratio of PGs might not be altered when the intracellular concentration of each PG was not higher than K_m values of transport of each PG by ABCC4. Therefore, inhibition of ABCC4 is likely not to occur any side effects due to the disrupt of PG balance.

第3章 新規 PGE₂細胞外放出トランスポーターの探索

第1節 序

前章の結果から、ABCC4 阻害薬は特定の細胞に対して選択的に作用し、PG バランスへの影響が小さい可能性を示し、ABCC4 を治療標的とすることの有用性を示した。しかし一方で、PG の細胞外放出における ABCC4 の寄与は部分的であったことから、ABCC4 を標的とした薬剤は効果不十分となることが懸念された。前章で A549 細胞、HMC-1 細胞の ABCC4 や TE671 細胞のエキソサイトーシスを抑制しても細胞外 PG は完全には消失しなかったことから、他の細胞外放出経路が存在すると考えられる。前出のリン脂質メディエーター S1P の赤血球からの細胞外放出には近年同定された Mfsd2b の他に、以前から ATP 依存的なトランスポーターの関与も示唆されており¹⁰⁰、PG の細胞外放出においても ABCC4 を含む複数のトランスポーターが関与すると推測された。そこで、本章では新たな PG 細胞外放出トランスポーターを探索することで PG 細胞外放出の分子メカニズムをさらに明らかにし、PG 細胞外放出トランスポーターを標的とした治療戦略の情報基盤を構築することとした。

PG 細胞外放出トランスポーターを同定するためには、そのトランスポーターが機能している細胞を用いて駆動力、速度論パラメーター、基質認識性に関する情報を収集することが必要である。実際、現在では同定されている胆汁酸やコリンのトランスポーターについても、肝細胞株、肺細胞株を用いて収集した情報がクローニングに利用された¹⁰¹⁻¹⁰⁴。こうした情報は細胞をそのまま適用することもあるが、胆汁酸やコリンの場合には細胞内での生合成や代謝の影響を避けるために、細胞から膜小胞を作製し検討に用いられた。PG も細胞内で生合成、代謝されることから、本研究においても膜小胞を用いて検討する必要があると考えた。さらに膜小胞を用いることで、放出方向の速度論パラメーターの導出が可能であると考えた。すなわち、ABC トランスポーターは外部から添加した ATP と結合できるのは反転した膜小胞のみであるため、膜小胞内へ取り込まれた PG 量を測定することで放出方向の評価

が可能となる¹⁰⁵。また、膜小胞外を細胞内、膜小胞内を細胞外と見立てイオン等の濃度勾配や膜電位を自由に形成できることから、SLC トランスポーターの放出方向の関与についても検証可能である。以上のことから、膜小胞を用いた輸送実験が本章にも適する手法であると考え適用することとした (Fig. 22)。

本章では PGE₂ に絞り検討を行うこととした。PGE₂ は既に複数の SLC トランスポーターによって細胞内へ取り込まれることがトランスポーター過剰発現細胞を用いた輸送実験で示されている¹⁰⁶⁻¹⁰⁹。このことから、既報と本研究から得られる結果との照合により既知トランスポーターの関与の可能性について検証できると考えた。加えて、PGE₂ は炎症性疾患、心血管系疾患、がんなどに関与することから^{4,9,10,14}、トランスポーターを介した PGE₂ 放出抑制を実現することができれば様々な疾患に対する新たな治療戦略になりうると考えた。

前章の結果から PGE₂ 細胞外放出に ABCC4 とは別の経路が関与していることが示唆された A549 細胞を用いて、本章では膜小胞を作製して輸送実験を行い PGE₂ 輸送の駆動力、速度論パラメーター、基質認識性を評価することでトランスポーターの探索を試みた。

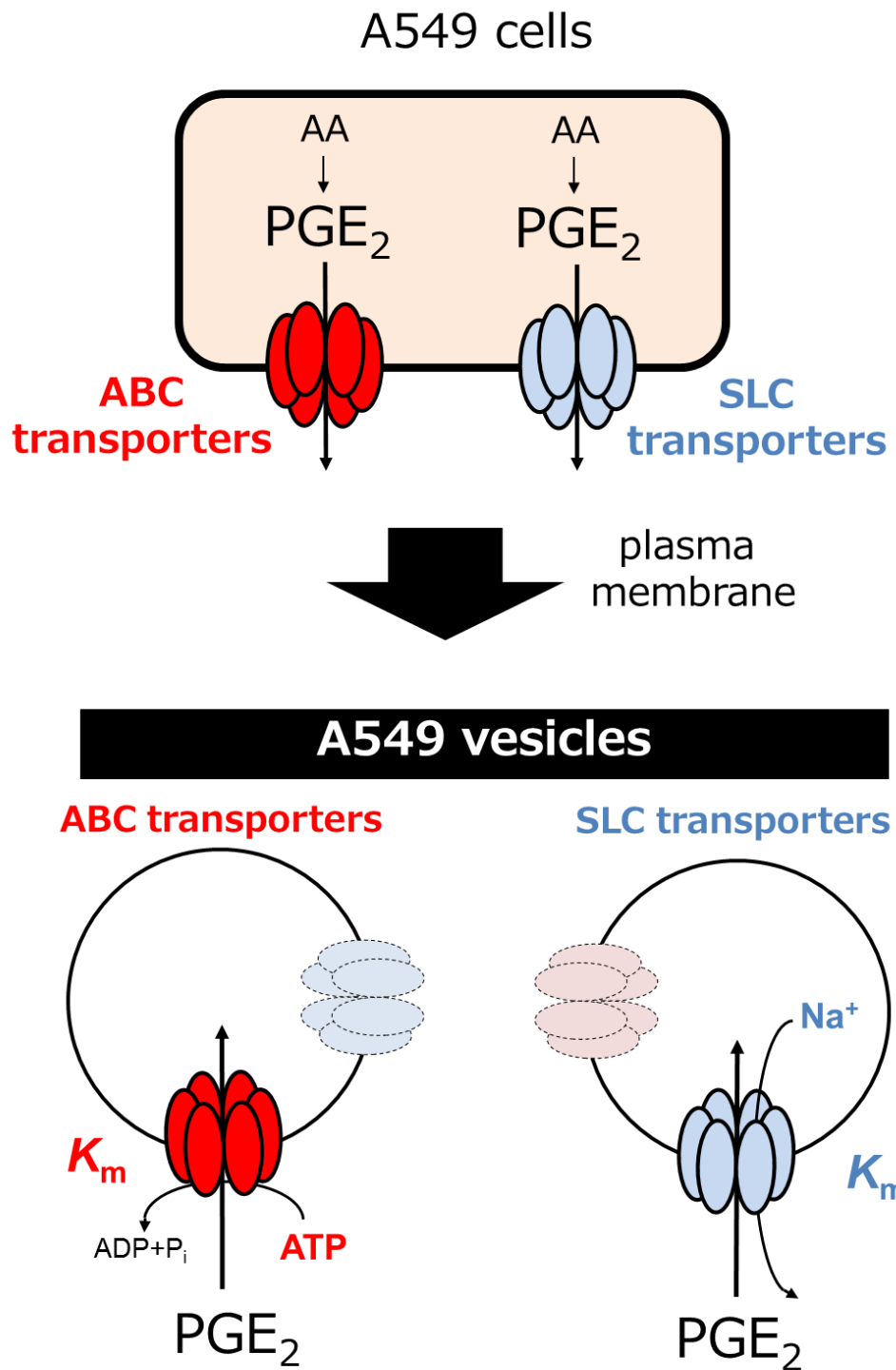
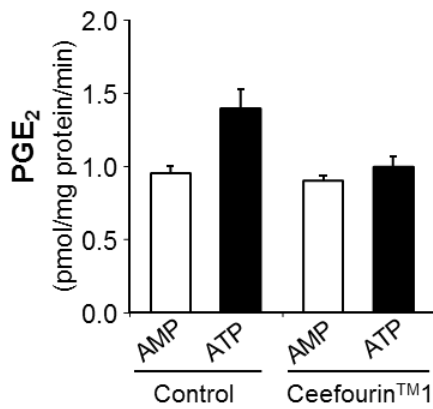
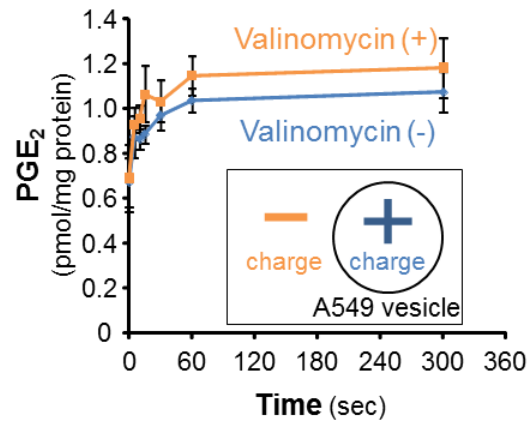
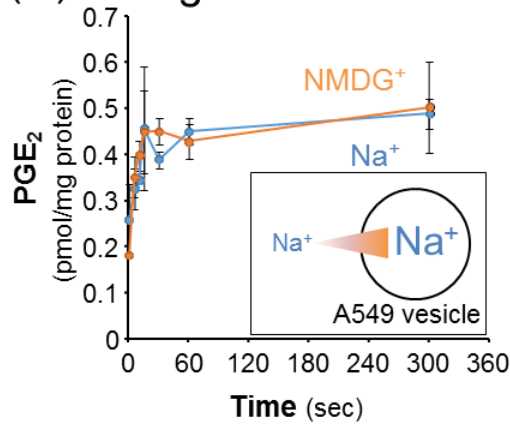
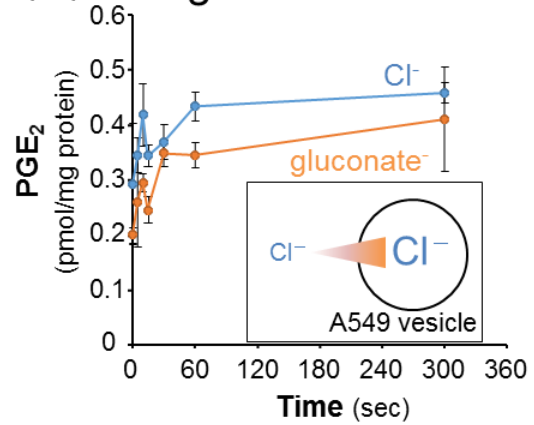


Fig. 22 Searching strategy of novel PGE₂ release transporter.

PGE₂ release from cells can be evaluated as PGE₂ uptake in vesicular transport assay by setting various potential energy such as Na⁺-gradient. Therefore, kinetic parameters, in particular Michaelis constant values (K_m), can be acquired.

第2節 A549 細胞膜小胞を用いた PG 輸送の駆動力探索

A549 細胞から作製した膜小胞は ATP 依存的 PGE₂ 輸送を示し、10 μ M CeefourinTM 1 で完全に抑制された (Fig. 23A)。このことから、A549 細胞からの PGE₂ 放出に関与する ABC トランスポーターはほとんど ABCC4 で占められることが判明したため、以降は SLC トランスポーターに焦点を絞り細胞膜透過の特性解析を進めることとした。まず、輸送基質の濃度勾配ポテンシャルエネルギーを利用する促進拡散型トランスポーターが介在する可能性を検証するために、膜小胞外に K₂SO₄ 存在条件下でカリウムイオノフォアであるバリノマイシンを加え膜小胞内が正の膜電位を生成させたが¹¹⁰、PG 輸送の増大はわずかであった (Fig. 23B)。次に、Na⁺勾配を駆動力として利用する二次性能動輸送トランスポーターが介在する可能性を検証するために、膜小胞内を Na⁺存在条件 (100 mM NaCl) または非存在条件 (100 mM N-methyl-D-glucamine chrolide) にして PGE₂ 取り込み実験を行ったところ、取り込み増大は見られなかった (Fig. 23C)。同様に Cl⁻勾配の関与を調べるため、膜小胞内を Cl⁻存在条件 (100 mM NaCl) または非存在条件 (100 mM Sodium gluconate) にしても、PGE₂ 取り込みの増大は見られなかった (Fig. 23D)。H⁺勾配を駆動力として利用するトランスポーターが介在する可能性を検証するために、膜小胞内 pH7.4 に固定して膜小胞外 pH を 5.0 から 9.0 まで変化させたところ、pH 低下に伴い PGE₂ 取り込みが増大した (Fig. 24A)。膜小胞外 pH6.0 に固定して PGE₂ 取り込みの経時変化について調べたところ、輸送時間 60 秒をピークとするオーバーシュート現象が観察され、濃度勾配に逆らい能動的に輸送されている可能性が示された (Fig. 24B)。さらに、H⁺勾配がこの能動輸送の駆動力であることを確認するために、膜小胞内外とも pH6.0 にしたところ、オーバーシュート現象は消失した (Fig. 24C)。以上の結果から、PGE₂ 輸送に H⁺勾配を駆動力として利用するトランスポーターが介在する可能性を示した。

(A) ATP**(B) Membrane potential****(C) Na⁺-gradient****(D) Cl⁻-gradient****Fig. 23 PGE₂ transport into A549 vesicles in various condition.**

A549 vesicles (25 μ g) were incubated at room temperature with 0.5 μ M PGE₂ in 250 mM sucrose and 50 mM HEPES-Tris (pH7.4). (A) A549 vesicles were incubated with 4 mM ATP or AMP for 1 min. CeefourinTM 1 (10 μ M) was used as an ABCC4 inhibitor. (B) A549 vesicles were preincubated in 50 mM K₂SO₄, 100 mM sucrose with or without 10 μ M valinomycin at room temperature for 30 min. Then PGE₂ (0.5 μ M final) was added to initiate transport. (C) A549 vesicles were containing of 100 mM NaCl or N-methyl-D-glucamine chrolide and 50 mM sucrose in intravesicular space. (D) A549 vesicles were containing of 100 mM NaCl or sodium gluconate and 50 mM sucrose in intravesicular space. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3).

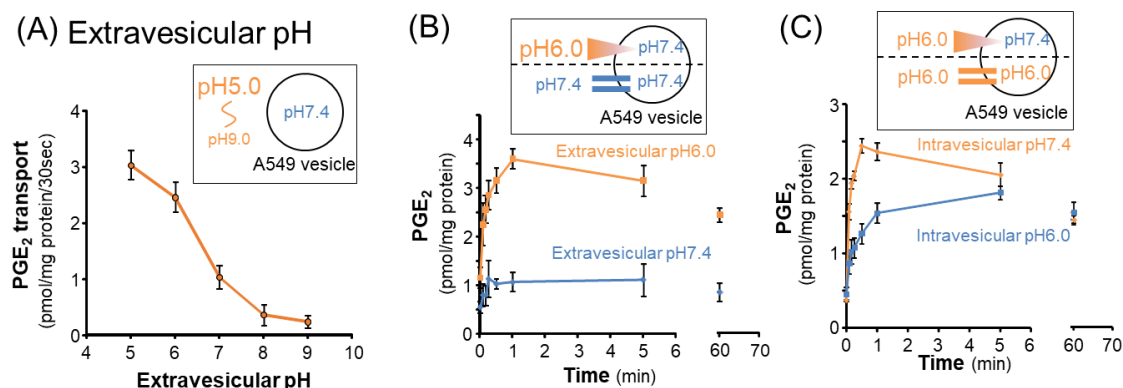


Fig. 24 H⁺-gradient dependent PGE₂ transport into A549 vesicles.

A549 vesicles (25 μ g) were incubated at room temperature with 0.5 μ M PGE₂ in 250 mM sucrose and 50 mM MES-Tris (pH5.0, pH6.0), HEPES-Tris (pH7.0, pH7.4), or Tris-HCl (pH8.0, pH9.0). (A) The effects of extravesicular pH to PGE₂ transport into A549 vesicles. (B) Time-dependent transport of PGE₂ into A549 vesicles. Extravesicular pH was set at 6.0 or 7.4 and intravesicular pH was set at 7.4. (C) The effect of H⁺-gradient to PGE₂ transport into A549 vesicles. Extravesicular pH was set at 6.0 and intravesicular pH was set at 6.0 or 7.4. Rates of PGE₂ transport in (A) were calculated by subtracting the uptake into A549 vesicles at 0 sec from the uptake into A549 vesicles at 30 sec. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3).

第3節 A549細胞からのPGE₂放出におけるH⁺勾配の関与

これまでにH⁺勾配がPGの細胞外放出に関与することを示した報告はない。そこで、A549細胞の細胞内外でH⁺勾配を形成させた場合にPGE₂放出が促進されるか検証することとした。A549細胞にpH5.5の緩衝液を5分間添加することで、細胞内pHが7.7から6.9へ低下した (Fig. 25A, B)。その後pH7.4の緩衝液に置換することでH⁺勾配を形成できると考え、置換後のPGE₂細胞外放出を評価することとした。

pH5.5の緩衝液を5分間添加後の細胞外・細胞内PGE₂量は、pH7.4の緩衝液5分間添加と比較して、それぞれ57%、24%減少し、細胞外/細胞内量比は有意に減少した (Fig. 25C-E)。その後pH7.4の緩衝液に置換したところ、pH5.5の緩衝液でのブレインキュベーションにより5分後のPGE₂細胞外・細胞内量はそれぞれ260%、10%増加し、細胞外/細胞内量比は有意に増大した (Fig. 25F-H)。以上の結果から、H⁺勾配依存的PGE₂輸送は実際にA549細胞からのPGE₂放出に関与する可能性を示した。

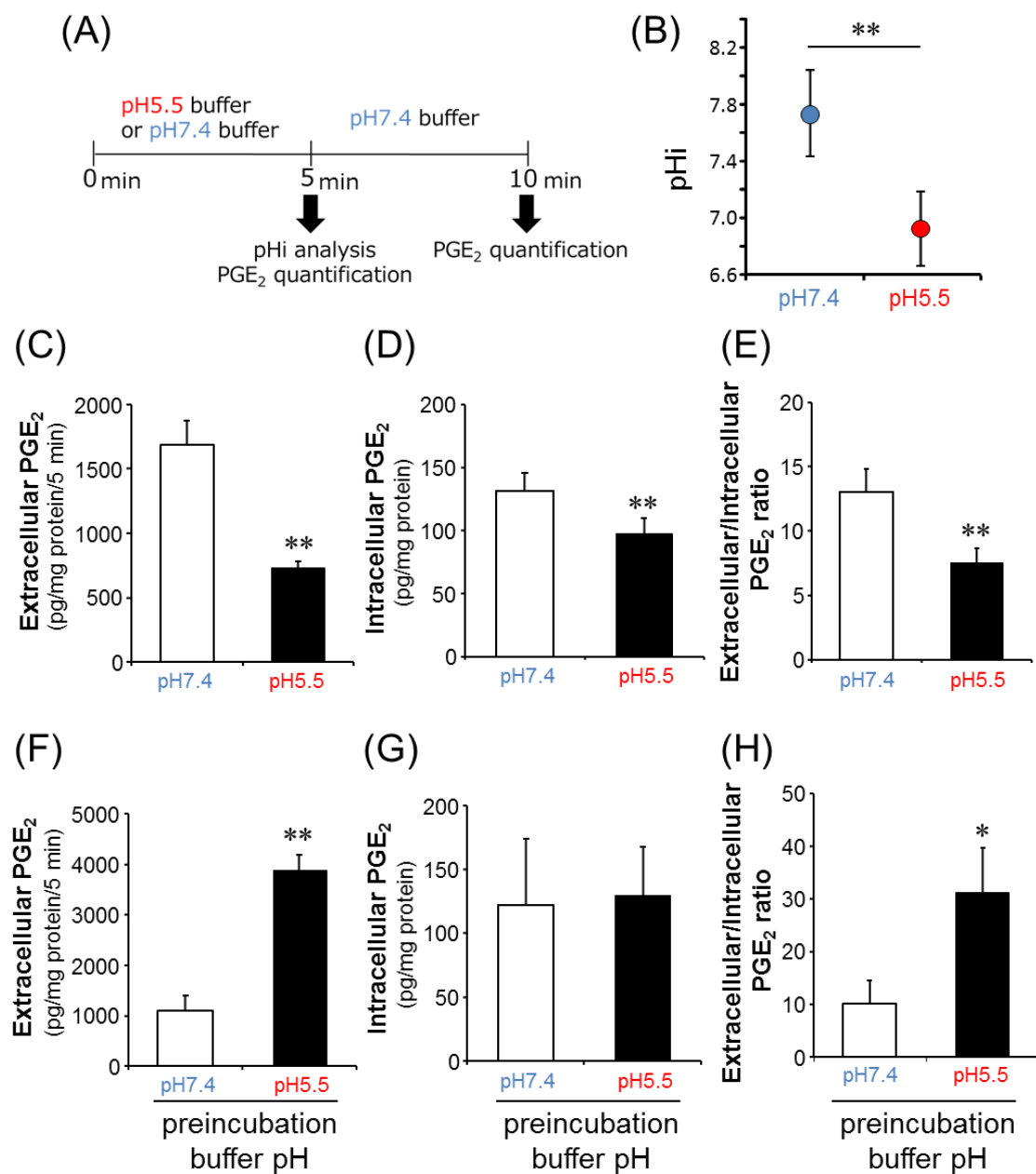


Fig. 25 Effects of H⁺-gradient formation to PGE₂ release from A549 cells.

(A) Experimental scheme of H⁺-gradient formation in A549 cells. (B) Intracellular pH (pHi) of A549 cells after incubation with pH 7.4 or pH 5.5 buffer. Each point represents the mean \pm S.D. (n = 6). (C - E) Extracellular and intracellular levels of PGE₂ in A549 cells after incubation with pH 7.4 or pH 5.5 buffer. Then extracellular/intracellular PGE₂ ratio was calculated. (F - H) Extracellular and intracellular levels of PGE₂ in A549 cells after replacement from pH 7.4 or pH 5.5 buffer to pH 7.4 buffer. Then extracellular/intracellular PGE₂ ratio was calculated. Each column in (C - H) represents the mean with S.D. (n = 3). Representative experiments are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

第4節 H⁺勾配依存的 PGE₂ 輸送の特性解析

次に H⁺勾配依存的 PGE₂ 輸送の濃度依存性及び阻害実験による速度論パラメーターの導出及び基質認識性に関する情報収集に着手した。A549 細胞膜小胞への H⁺勾配依存的取り込みは、PGE₂ 添加濃度を 500 μM までに上昇させた場合においても飽和を示さなかった (Fig. 26A)。また、SLC22 ファミリーに属する organic anion transporter (OAT) の基質である *p*-アミノ馬尿酸、SLC21 ファミリーに属する organic anion transporting polypeptide (OATP) の基質であるブロモスルホフタレインは PGE₂ 輸送を阻害しなかった (Fig. 26B)。OAT、OATP の PGE₂ 輸送における K_m はそれぞれ 154 - 970 nM¹⁰⁸、55.5 - 94 nM^{26, 107} と比較的高い親和性を示した報告も考慮すると、OAT や OATP が関与する可能性は低いと考えた。一方で、SLC16 ファミリーに属する monocarboxylate transporter (MCT) 6 は PGF_{2α} を輸送することが報告されており¹¹¹、SLC16 ファミリーの典型的基質とされている乳酸の K_m が 3.5 mM (MCT1)、0.74 mM (MCT2)、28 mM (MCT4) であることが知られている¹¹²。このことから、A549 細胞膜小胞の H⁺勾配依存的 PGE₂ 輸送は特に MCT が関与している可能性を考え、次に種々のカルボン酸 (10 mM) 存在条件下で PGE₂ 輸送が阻害されるか検討した。その結果、H⁺勾配依存的 PGE₂ 輸送は MCT1 - 4 の輸送基質である L-乳酸、D-乳酸でそれぞれ 36 %、20 %減少傾向を示した。また、芳香族モノカルボン酸であるアセチルサリチル酸、サリチル酸、*p*-ニトロ安息香酸はそれぞれ 64 %、62 %、70 %の有意な阻害効果を示し、安息香酸も 59 %の阻害傾向 ($p = 0.0522$) を示した。一方でジカルボン酸であるマレイン酸、トリカルボン酸であるクエン酸は有意な阻害効果を示さなかった (Fig. 26C)。

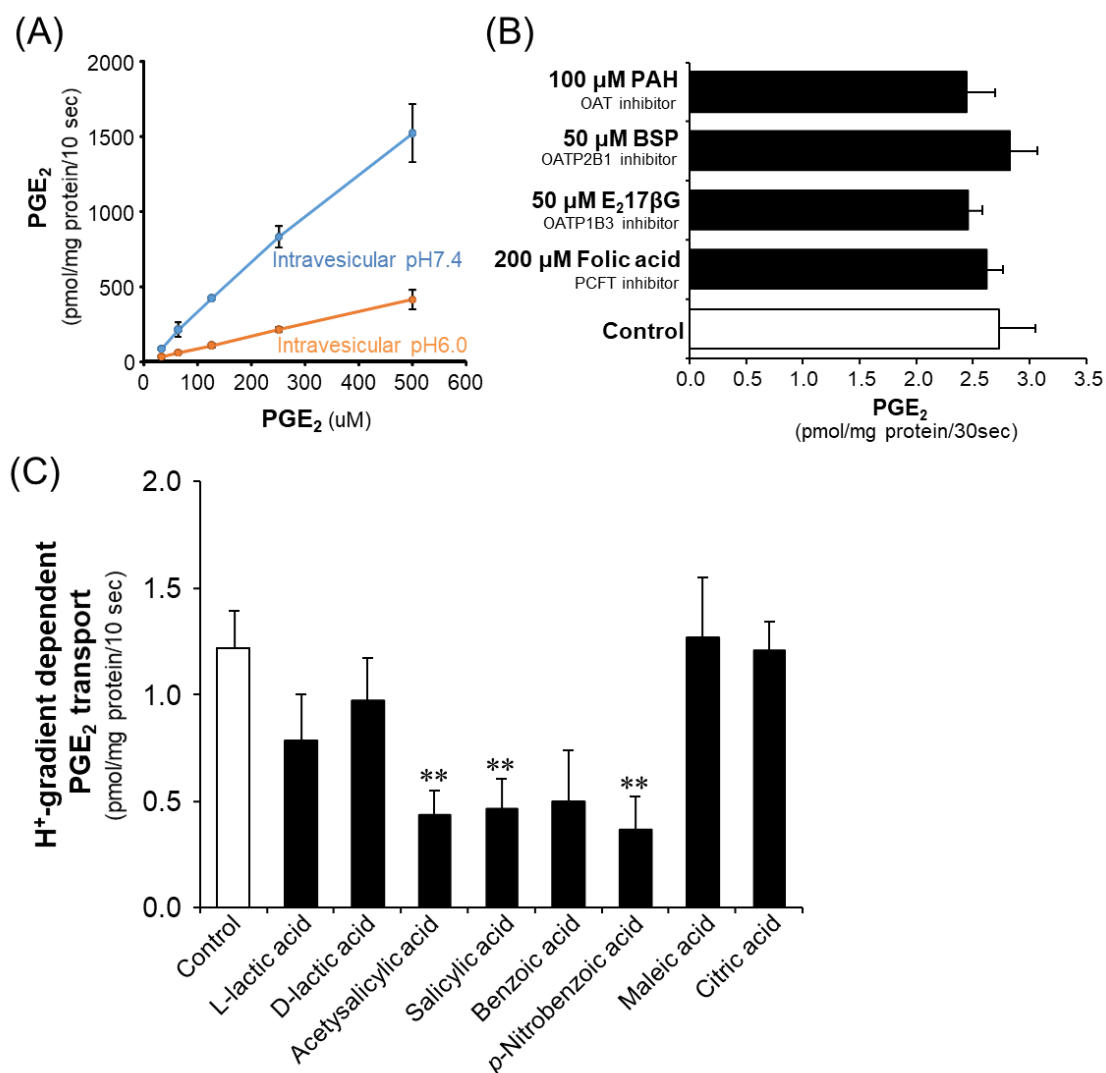


Fig. 26 Property of H⁺-gradient dependent transport of PGE₂ into A549 vesicles.

(A) Concentration-dependent transport of PGE₂ into A549 vesicles containing 250 mM sucrose and 50 mM HEPES-Tris (intravesicular pH7.4) or MES-Tris (intravesicular pH6.0). (B) Inhibitory effects of several transporter substrates. PAH: *p*-aminohippuric acid, BSP: bromosulphophthalein, E₂17βG: estradiol-17β-glucuronide. PCFT: proton coupled folate transporter (SLC46A1). (C) Inhibitory effects of carboxylic acids (10 mM) to PGE₂ transport into A549 vesicles. Rates of H⁺-gradient dependent transport were calculated by subtracting the uptake into A549 vesicles (intravesicular pH6.0) from the uptake into A549 vesicles (intravesicular pH7.4). Each point and column represents the mean \pm S.E. (n = 3).

第 5 節 考察

本章では PG 細胞外放出に寄与するトランスポーターの探索を目的として A549 細胞膜小胞を用いた輸送実験を行った結果、 Na^+ 勾配、 Cl^- 勾配、膜電位は PGE_2 輸送の駆動力とならないことが判明し (Fig. 23)、その一方で膜小胞外 pH の低下に伴い PGE_2 取り込みが増大した (Fig. 24A)。また、膜小胞外 pH6.0 に固定し、膜小胞内 pH7.4 にした際には取り込み時間 60 秒までに一過的な膜小胞内への PGE_2 蓄積が見られ、その後減少するオーバーシュートが観察された (Fig. 24B)。一方で膜小胞内 pH6.0 にした場合にはオーバーシュートは観察されず、取り込み時間 5 分から 60 分までの PGE_2 蓄積量は変化していなかった (Fig. 24C)。取り込み時間 60 分は PGE_2 の膜小胞内濃度と膜小胞外濃度が平衡状態に達するに十分な時間であることから、取り込み開始 60 秒で一過的に PGE_2 が蓄積した際、 PGE_2 の膜小胞内濃度が膜小胞外濃度を上回っていたと考えられる。 H^+ 勾配はこの PGE_2 の濃度勾配に逆らった取り込みにおけるポテンシャルエネルギーとして利用された後、膜小胞内 pH も 6.0 となり H^+ 勾配が消失し、 PGE_2 濃度勾配に従って膜小胞内から膜小胞外へ拡散したことで PGE_2 蓄積量が減少し、オーバーシュートが形成されたと推察される (Fig. 27)。

H^+ 勾配を駆動力とし、 PGE_2 500 μM でも飽和性を示さなかった低い親和性から (Fig. 26A)、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ を pH 依存的に輸送する MCT6 が属し¹¹¹、典型的基質である乳酸の K_m が 0.74 - 28 mM と低親和性を示すことが知られる SLC16 ファミリーが関与すると考えた¹¹²。SLC16 ファミリーのトランスポーターが PGE_2 輸送に寄与している場合、モノカルボン酸によってその輸送は阻害されると考え阻害実験を行った結果、L-乳酸、D-乳酸による阻害効果はそれぞれ 36 %、20 %であった (Fig. 26C)。乳酸による阻害効果は小さかったものの、L 体と D 体で異なる傾向を示した。MCT1、2 及び 4 に対する L-乳酸の阻害効果は D-乳酸に比べ強力であることが知られており^{113, 114}、一部は MCT1、2 または 4 が H^+ 勾配依存的 PGE_2 輸送に関与する可能性が考えられる。また、 H^+ 勾配依存的 PGE_2 輸送は芳香族モノカルボン酸 (10 mM) によって 59 - 70 %抑制された。このことから、 H^+ 勾配依存的 PGE_2 輸送の大部分は芳香族モ

ノカルボン酸を輸送基質とするトランスポーターが寄与する可能性が示唆された。

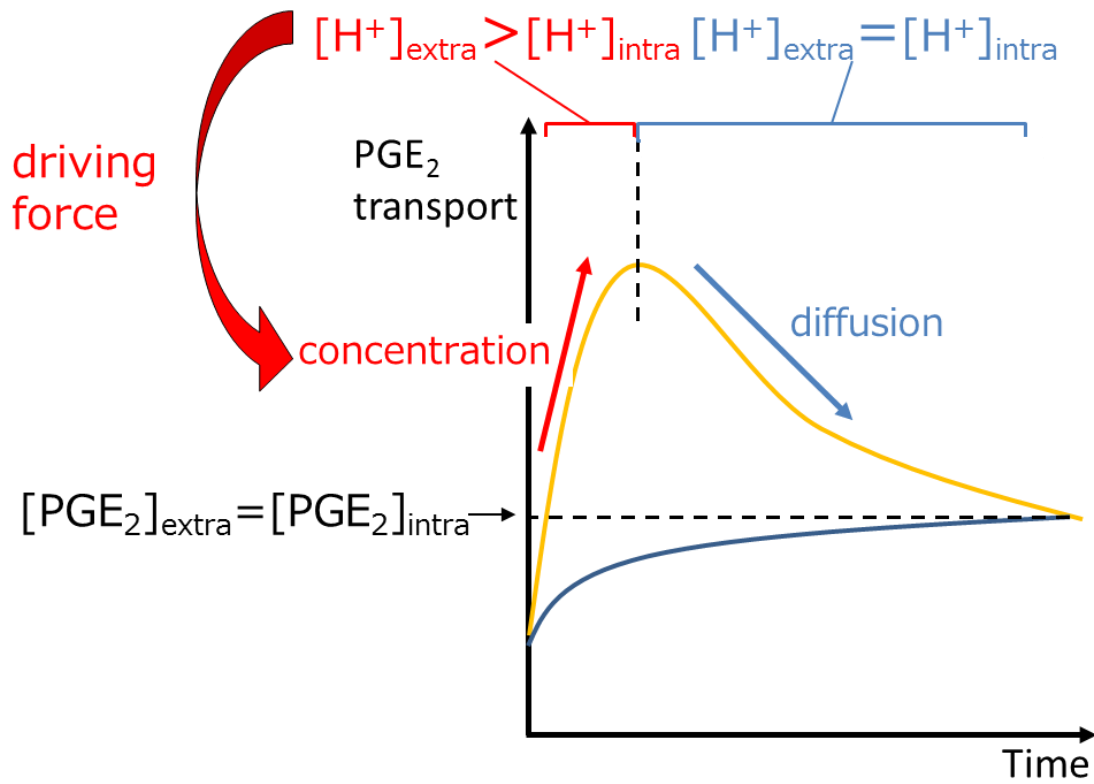


Fig. 27 Explanation of overshoot phenomenon in PGE₂ transport.

In initial phase, H⁺-gradient ($[H^+]_{extra} > [H^+]_{intra}$) play a role as a driving force for PGE₂ concentration into A549 vesicles. Intravesicular pH will decrease as PGE₂ and H⁺ are co-transported into A549 vesicles, and after intravesicular pH reaches 6.0, concentration of PGE₂ into A549 vesicle will be stopped and diffusion according to the gradient of PGE₂ concentration will be initiated until intravesicular PGE₂ concentration is equal to extravesicular concentration.

一方で、実験的証明はなされていないものの H^+ 勾配が受動拡散による PG 細胞外放出に寄与する仮説も存在する¹¹⁵。また、脂質から人工的に作られトランスポーターを含まない膜小胞においてもサリチル酸が pH 低下とともに取り込みが増大し、オーバーシュート現象を示すことが報告されている¹¹⁶。このメカニズムは次のように説明される (Fig. 28)。pH 分配仮説に基づいて、イオン型に比べ細胞膜を容易に透過できる分子型の割合が pH 低下に伴い増大し、膜小胞内へと拡散する。その後膜小胞内で H^+ が乖離してイオン型となり膜透過できなくなることで膜小胞内に蓄積する。乖離した H^+ により膜小胞内 pH が低下すると、膜小胞内でも分子型の割合が増大し、蓄積した分子が膜小胞外へ拡散することで平衡に達する。このメカニズムでは膜小胞内への競合的な取り込み抑制は生じないが、モノカルボン酸として流入した H^+ により膜小胞内 pH が低下すると、膜小胞内から膜小胞外への拡散速度が上昇するため、みかけの取り込みが抑制されると考えられる。10 mM アセチルサリチル酸 ($pK_a = 3.49$)、サリチル酸 ($pK_a = 2.97$)、*p*-ニトロ安息香酸 ($pK_a = 3.44$) は pH6.0 でそれぞれ 31、9.3、28 μM の分子型が存在すると推測され、この条件で H^+ 勾配依存的 PGE_2 輸送を 62 - 70 % 有意に阻害したことから、膜小胞内 pH 低下を生じさせるのに十分な量の分子型が存在していたと考えられる。一方で PGE_2 ($pK_a \approx 5$) は pH6.0 で 500 μM 中に 50 μM の分子型が存在すると推測されるが、 PGE_2 取り込みの濃度依存性実験 (Fig. 26A) の結果から、500 μM でも取り込みの飽和は示されなかった。 PGE_2 は $\log P = 2.82$ と、芳香族モノカルボン酸 (アセチルサリチル酸 : $\log P = 1.19$ 、サリチル酸 : $\log P = 2.26$ 、*p*-ニトロ安息香酸 : $\log P = 1.89$) に比べ脂溶性が高く容易に膜透過できると考えられる。それにもかかわらず芳香族モノカルボン酸による阻害実験の結果と乖離が生じたことから、pH 分配仮説によるメカニズムのみで説明するのは困難であると考ええる。しかしながら、現段階では pH 分配仮説に基づくメカニズムが全く関与しないことを示すデータはなく、トランスポーター介在性輸送と共存している可能性は否定できない^{117, 118}。

A549 細胞の PGE_2 細胞外放出における H^+ 勾配の関与を検証するために、pH5.5 の緩衝液を添加することで細胞内 pH を低下させ、その後 pH7.4 の緩衝液に置換することで細胞外 < 細

細胞内の H^+ 勾配を形成させた。その結果、細胞外への PGE_2 放出量が増大したことから、細胞外放出に H^+ 勾配が寄与する可能性を示した (Fig. 25F - H)。また、pH7.4 の緩衝液に置換する前は細胞内 (pH6.9) < 細胞外 (pH5.5) の H^+ 勾配が形成されていたと考えられ、この時の PGE_2 細胞外量は pH7.4 の緩衝液で前処理した場合と比べ有意な減少を示した (Fig. 24C - E)。このことから、両方向にはたらく H^+ 勾配依存的トランスポーターが細胞レベルでも PGE_2 輸送に関与している可能性を示した。この結果はこれまで乳酸を両方向に輸送すると考えられている MCT の関与を支持するものとする¹¹²。

通常、細胞内 pH は細胞膜やオルガネラに存在するチャネルやトランスポーターにより厳密に制御されており¹¹⁹、正常細胞では細胞外 < 細胞内の H^+ 勾配はほとんど形成されないと考えられる。一方で一部のがん細胞ではグルコースから乳酸への代謝が亢進しており (Warburg 効果)、細胞内 H^+ 濃度の上昇に対応するために MCT を含め H^+ を細胞外へ放出する様々なトランスポーターの発現が上昇することが知られている¹¹⁹⁻¹²²。このようなトランスポーターが本章で示された H^+ 勾配依存的 PGE_2 放出を担っているとすれば、標的とすることでがん細胞への選択性を高めることができると期待される。 PGE_2 はがん微小環境においてがん細胞増殖作用に加え、がん免疫抑制作用を示すことが知られており^{123,124}、近年 EP4 阻害薬が抗がん薬としても開発されている。このことから、がん微小環境における PGE_2 放出の抑制は有効な手段になりうるものと考えられ、その実現に向けたトランスポーターの同定及び特異的阻害薬の探索のための一助に本章の結果はなりうるものとする。

以上、本章で遂行した A549 細胞膜小胞を用いた輸送実験により、ABCC4 に加え H^+ 勾配依存的な PGE_2 放出トランスポーターが存在する可能性を示した。この H^+ 勾配依存的輸送は、 PGE_2 500 μM まで輸送速度の飽和が見られないことから親和性が低く、また芳香族モノカルボン酸により阻害される可能性を示した。

Diagram illustrating a concentration gradient across a membrane (A549 vesicle).

On the left (pH 6.0):

- R-COOH (permeable) is in equilibrium with $\text{R-COO}^- + \text{H}^+$ (impermeable).

A thick arrow labeled "concentration" points from left to right, indicating a concentration gradient.

On the right (A549 vesicle, pH 7.4):

- R-COOH (permeable) is in equilibrium with $\text{R-COO}^- + \text{H}^+$ (impermeable, highlighted in a red box).
- The concentration of $\text{R-COO}^- + \text{H}^+$ is labeled as "increase".

60 sec - 60 min

A549 vesicle

diffusion

R-COOH
permeable

pH 6.0

R-COO⁻ + H⁺
impermeable

R- =

The diagram illustrates the mechanism of a pH-sensitive membrane transport system. An A549 vesicle is shown with a pH of 6.0. Inside the vesicle, the molecule is in its protonated form, R-COOH, which is permeable and can diffuse out. Outside the vesicle, the molecule is in its deprotonated form, R-COO⁻, which is impermeable. The chemical structure of the R- group is shown as a long-chain molecule with a cyclopentane ring and two hydroxyl groups.

In initial phase (0-60 sec), permeable form of PGE₂ (neutral charge) can enter the A549 vesicles. Then H⁺ is dissociated from PGE₂ and PGE₂ has negative charge (impermeable form) and is accumulated into A549 vesicles. When intravesicular pH reaches 6.0 by H⁺ imported with PGE₂ around 60 sec, permeable form of PGE₂ in intravesicular space increases and diffuse to extravesicular space. Therefore, PGE₂ accumulated in A549 vesicle decreases in a time-dependent manner.

総括

PG は炎症やアレルギー、がんなど多様な疾患に関与し、PG シグナルの抑制がこれらの疾患治療に有効である。これまで開発・上市された NSAIDs を含む合成酵素阻害薬、受容体阻害薬は上記疾患に対する有効性を示しており、PG を標的とした創薬研究は治療上有用であると期待される。PG は細胞内で生合成された後、細胞膜上に発現する受容体に結合するために、細胞外放出過程が必須である。このことから、細胞外放出過程も創薬標的となりうるものの、その有用性を評価するための情報が不足しているのが現状であった。そこで本研究ではトランスポーターに着目して PG 細胞外放出メカニズムに関する情報を収集することで、PG 細胞外放出トランスポーターを新たな創薬標的とするための情報基盤を構築することとした。

本研究ではまず、PG 細胞外放出トランスポーターとして知られる ABCC4 に着目し、ABCC4 阻害効果の細胞選択性と、ABCC4 阻害による PG バランス変化の 2 点について評価を行うこととした。PG バランス変化を評価するために 2-series PG のみならず 3-series PG を対象とする細胞内外同時測定法が必要であったため、第 1 章で構築に着手した。その結果、細胞外サンプル測定法は R.S.D.が 0.8 - 10.9 % (日内)、0.9 - 9.3 % (日間)、R.E.が -12.8 - 5.5 % (日内)、-8.3 - 3.3 % (日間) であった。また、細胞内サンプル測定法は、R.S.D.が 0.9 - 7.5 % (日内)、1.2 - 9.9 % (日間)、R.E.が -15.5 - 8.6 % (日内)、-7.8 - 1.6 % (日間) であった。以上より、2-series PG と 3-series PG の細胞内量と細胞外量を分離して測定可能な手法を構築した。

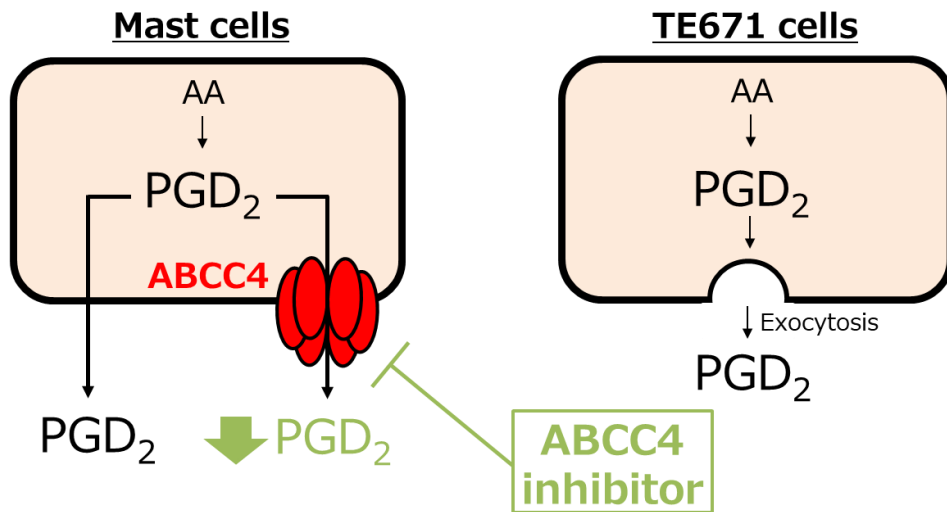
第 1 章で構築した測定法を応用し、第 2 章では肥満細胞株 (HMC-1 細胞、RBL-2H3 細胞) と TE671 細胞を使用し、ABCC4 阻害効果の細胞選択性と、ABCC4 阻害による PG バランス変化の評価を行った。その結果、ABCC4 を阻害することで肥満細胞からの PGD₂ 放出は抑制されたが、ヒト小脳髄芽細胞由来 TE671 細胞からの PGD₂ 放出は抑制されなかった (Fig. 29A)。また、A549 細胞を用いて ABCC4 阻害時の 2-series PG/3-series PG 細胞外量比の変化

を調べた結果、ABCC4 を介した輸送において互いに競合することが考えられる高い細胞内 PG 濃度でなければ、PG バランスの変化は認められない可能性を示した (Fig. 29B)。以上から ABCC4 阻害薬は、ABCC4 が PG 細胞外放出に寄与する細胞に対して選択的に作用し、PG バランスの変化を起こしにくいことから安全性に優れる可能性を示した。一方で、ABCC4 の寄与は部分的であり、ABCC4 阻害薬は効果不十分となることが懸念された。

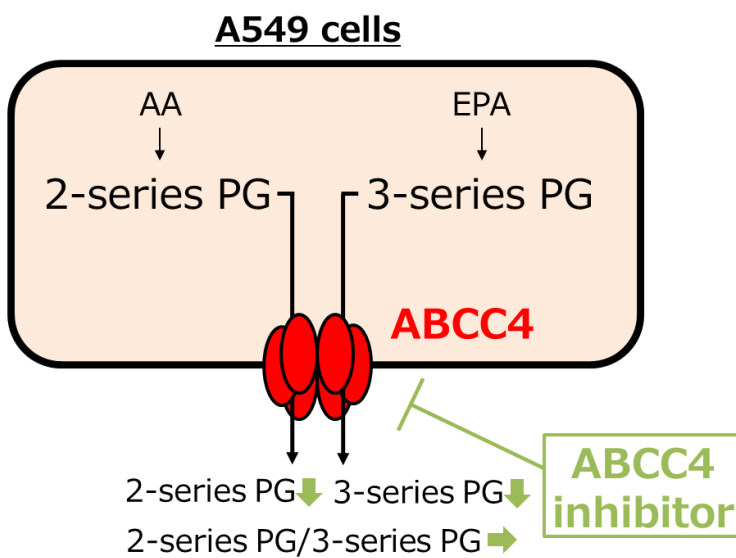
第 3 章では、PG 細胞外放出に寄与する新たなトランスポーターの同定に向けた輸送特性解析を行った。A549 細胞から作製した膜小胞を用いた輸送特性解析の結果、 H^+ 勾配を駆動力とし、 PGE_2 500 μM までに輸送速度の飽和が見られない低親和性の輸送機構の存在が明らかとなった。このことから、モノカルボン酸トランスポーターが関与すると推測し阻害実験を行ったところ、複数の芳香族モノカルボン酸 (10 mM) が H^+ 勾配依存的 PGE_2 輸送を 62-70 %有意に阻害した。実際に A549 細胞からの PGE_2 細胞外放出に寄与していることを確認するために細胞外 < 細胞内の H^+ 勾配を形成させた結果、 PGE_2 細胞外放出が増大することを示した (Fig. 29C)。

本研究の成果からは、トランスポーターを介した PG 細胞外放出メカニズムの全容解明に未だ至っていない。しかしながら、第 1 章で構築した PG 測定法を応用し、第 2 章と第 3 章で膜小胞を用いた PG 輸送実験、細胞を用いた PG 放出実験を行うことにより、ABCC4 を標的とした治療効果の推定及び ABCC4 に続く新たな PG 細胞外放出トランスポーターの探索を可能にした。本研究で新たに見出したトランスポーターについて、今後 ABCC4 と同様に細胞選択性、PG バランスへの影響を評価することにより治療標的となりうるか推定することができる。以上より、本研究の成果は PG 細胞外放出トランスポーターを標的とする治療戦略立案に向けた基盤となる細胞外放出メカニズムの解明に貢献すると期待される。

(A) Cell selectivity of ABCC4 inhibitor



(B) PG selectivity of ABCC4 inhibitor



(C) Another PG release transporter

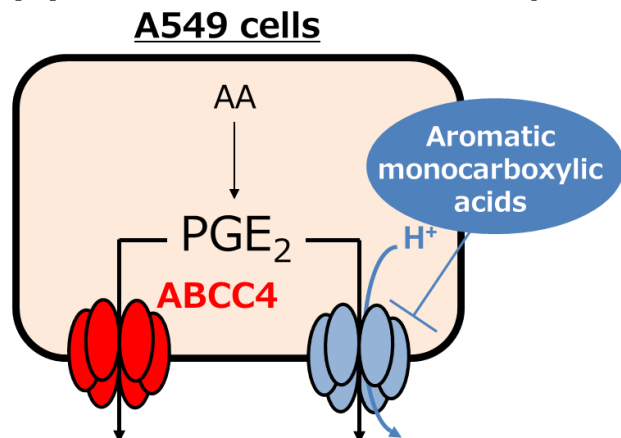


Fig. 29 Conclusion of this research.

- (A) ABCC4 inhibitors could suppress the release of PGD₂ from mast cells. However, PGD₂ release from TE671 cells was not suppressed by ABCC4 inhibitors. These results suggested that inhibition of ABCC4 could suppress the release of PG from the certain types of cells in which ABCC4 functions as a PG exporter.
- (B) The extracellular levels ratio of PGs might not be altered when the intracellular concentration of each PG was not higher than K_m values of transport of each PG by ABCC4. Therefore, inhibition of ABCC4 is likely not to occur any side effects due to the disrupt of PG balance.
- (C) It was shown that H⁺-gradient dependent transporter was involved in PGE₂ release from A549 cells. This H⁺-gradient dependent transport of PGE₂ was strongly inhibited by several monoaromatic carboxylic acids (10 mM), which might be substrates of this transporter. In the future study, the information of the cell in which this transporter contributes and the PG selectivity should be acquired, like ABCC4. These information will be useful to evaluate whether this transporter will be therapeutic target.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科病態分子薬学分野 教授 眞野 成康 先生 に謹んで謝意を表します。

本博士論文を査読頂き、貴重な御助言、御指導を賜りました東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野 教授 寺崎 哲也 先生 に謹んで謝意を表します。

本博士論文を査読頂き、貴重な御助言、御指導を賜りました東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野 教授 青木 淳賢 先生 に謹んで謝意を表します。

多くの有益な御助言、御指導戴くと共に、常に本研究を支えて下さいました東北大学大学院薬学研究科病態分子薬学分野 准教授 山口 浩明 先生 に深く感謝致します。

多くの有益な御助言、御指導戴きました東北大学病院薬剤部 准教授 小原 拓 先生、講師 菊地 正史 先生、助教 前川 正充 先生、助教 小倉 次郎 先生、助手 金光 祥臣 先生 に深く感謝致します。

肥満細胞を用いた脱顆粒試験において貴重な御助言、御指導戴きました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 教授 平澤 典保 先生、実験の遂行にご協力頂きました研究員 川井 絢也 様 に深く感謝致します。

長きに亘り本研究の遂行を支えて下さいました北海道大学薬学研究院臨床薬剤学研究室 教授 井関 健 先生、准教授 小林 正紀 先生、助教 鳴海 克哉 先生、助教 古堅 彩子 先生に謹んで謝意を表します。

実験や科学的議論の機会を提供してくださり、本研究の遂行に大きく影響を与えてくださいました東北大学大学院医学系研究科 教授 五十嵐 和彦 先生をはじめ生物化学分野の皆様、京都大学ウイルス・再生医科学研究所ウイルス感染研究部門感染防御研究分野 教授 竹内 理 先生をはじめ研究室の皆様、東邦大学薬学部薬物動態学教室 講師 佐々木 将太郎 先生、北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室の皆様にご心より深く感謝致します。

入社後に多大なる御理解、御協力を賜りました塩野義製薬株式会社 渋谷営業所の皆様、同期入社の皆様、並びにシオノギ総合サービス株式会社 人事本部の皆様にご心より深く感謝致します。

最後に、様々な面で支えて頂きました友人、そして家族にご心から感謝致します。

2019 年 3 月

実験の部

使用試薬

PGE₂、PGD₂、PGF_{2α}、TXB₂、6-keto PGF_{1α}、PGE₃、PGD₃、PGF_{3α}、TXB₃、Δ¹⁷-6-keto PGF_{1α}、PGE₂-d4、PGD₂-d4、PGF_{2α}-d4、TXB₂-d4、6-keto PGF_{1α}-d4、AA、EPA は Cayman Chemical から購入した。ふっ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) はナカライテスクから購入した。A23187、インドメタシン、MK571、E₂17βG、cGMP、dinitrophenyl-human serum albumin (DNP-HSA) は Sigma Aldrich から購入した。CeefourinTM 1 はアブカムから購入した。Exo 1 は Tocris Bioscience から購入した。Dibutylhydroxytoluene (BHT)、adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate、5'-adenylic acid (AMP)、sodium creatine phosphate hydrate、Acid Red 112 (ponceau-S)、N-methyl-D-glucamine chrolide、グルコン酸ナトリウム、L-乳酸、D-乳酸、アセチルサリチル酸、サリチル酸、*p*-ニトロ安息香酸、安息香酸、ブロモスルホフタレインは東京化成工業株式会社から購入した。Creatine kinase は Roche Applied Science から購入した。ジピリダモール、プロベネシド、葉酸、マレイン酸、クエン酸、*p*-アミノ馬尿酸は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。BCECF-AM は同仁化学研究所から購入した。バリノマイシン、ニゲリシンは LKT Laboratories から購入した。その他の試薬・溶媒は HPLC grade のものを使用した。

使用細胞

ヒト肺腺癌由来 A549 細胞は American Type Culture Collection より購入した。ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 (HEK/P.B.) 及び ABCC4 過剰発現 HEK293 細胞 (HEK/4.63) は Dr. Piet Borst (Netherlands Cancer Institute) より御供与いただいた。ヒト小脳髄芽細胞由来 TE671 細

胞は裏出良博先生（筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構）より御供与いただいた。ヒト肥満細胞由来 HMC-1 細胞は Dr. Joseph H. Butterfield (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) より御供与いただいた。ラット好塩基球性白血病細胞由来 RBL-2H3 細胞は平澤典保先生（東北大学大学院薬学研究科）より御供与いただいた。A549 細胞、HEK293 細胞、TE671 細胞は 37 °C-5 % CO₂ インキュベーター内で培養し、非働化した 10 % ウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM を培養液とした。継代は播種から 3 - 4 日目に、滅菌した Phosphate-buffered saline (PBS : 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) で細胞を洗浄後、0.25 % トリプシン及び 0.02 % EDTA を含む PBS により、フラスコから剥離させて行った。HMC-1 細胞は 37 °C-5 % CO₂ インキュベーター内で培養し、10 % 非働化 FBS、1.2 mM 1-thioglycerol (Sigma Aldrich) を含むイスコブ改変ダルベッコ培地 (IMDM) を培養液とした。培養液は 3 日ごとに半分 (7 - 8 mL) を交換し、さらに 3 日後に 20 × 10⁴ cells/mL となるように新しい 75 cm² 細胞培養用フラスコに継代した。

第 1 章 付属実験

使用機器

HPLC には Prominence 20A (Shimadzu) を使用した。分析カラムは CAPCELL PAK C18 MG II column (2.0 mm × 150 mm, 3 µm, Shiseido) を使用し、アセトニトリル/水/酢酸 (40 : 60 : 0.1, v/v/v) の移動相を 0.15 mL/min で流した。カラム温度は 40°C とした。

質量分析計にはトリプル四重極型質量分析計である API 3200™ LC/MS/MS System (Applied Biosystems) を使用し、エレクトロスプレーイオン化法により負イオン検出モード scheduled-selected reaction monitoring (SRM) により測定を行った。イオンソースにおける各

種パラメーターは以下のとおりである：Source temperature, 600 °C; spray voltage, -4500 V; curtain gas, 40 psi; ion source gas 1, 40 psi; ion source gas 2, 70 psi; collision gas, 5 arbitrary units

データは Analyst software (version 1.5) (Applied Biosystems) により解析した。

検量線、ストック溶液及びバリデーションサンプル

2-series PG と 3-series PG のストック溶液はそれぞれ 20 µg/mL、100 µg/mL の濃度でメタノールに溶解した。2-series PG の重水素標識体は 500 ng/mL の濃度でメタノールに溶解し、internal standard (IS) 溶液とした。ストック溶液及び IS 溶液は-30 °C で保存した。

検量線は、細胞外サンプルとして DMEM に、細胞内サンプルとしてリン酸緩衝液 (0.1 M sodium phosphate, 1 mM EDTA, 10 µM indomethacin, pH 7.4) にそれぞれ 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng/mL の濃度で調製し、0.5 mL ずつ分注した。

細胞外バリデーションサンプルは DMEM に 0.1, 0.5, 5, 50 ng/mL の濃度で調製し、0.5 mL ずつ分注した。また、細胞内バリデーションサンプルは、タンパク量が 2 mg/mL となるようにリン酸緩衝液で調製した A549 細胞ライセートを、Soto らの報告¹²⁵に従い活性炭処理し、得られた活性炭処理後のホモジネートに 0.1, 0.5, 5, 50 ng/mL の濃度で調製し、0.5 mL ずつ分注した。検量線サンプル及びバリデーションサンプルはすべて-80 °C で保存した。

第2章 付属実験

使用機器

HPLC には Prominence 20A (Shimadzu) を使用した。質量分析計には三連四重極型質量分析計である API 5000™ LC/MS/MS System (Applied Biosystems)を使用し、エレクトロスプレーイオン化法により負イオン検出モード selected reaction monitoring (SRM) により測定を行

った。イオンソースにおける各種パラメーターは以下のとおりである：Source temperature, 500 °C; spray voltage, -4500 V; curtain gas, 40 psi; ion source gas 1, 40 psi; ion source gas 2, 70 psi; collision gas, 5 arbitrary units

データは Analyst software (version 1.5) (Applied Biosystems) により解析した。

膜小胞調製

細胞を PBS (2 mM PMSF 含有) で洗浄し、セルスクレーパーで掻き取った後、3,000 rpm、5 分、4 °C で遠心し、得られたペレットを Hypotonic buffer (0.5 mM sodium phosphate, 0.1 mM EDTA, 2 mM PMSF, pH 7.4) に懸濁し、90 分、4 °C でインキュベートした。その後 100,000 × g、40 分、4 °C で遠心し、得られたペレットを TS buffer (250 mM Sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) に懸濁し、Dounce 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートを 500 × g、15 分、4 °C で遠心し、得られた上清を 100,000 × g、40 分、4 °C で遠心した。得られたペレットを 50 mM HEPES-Tris (pH7.4) もしくは MES-Tris (pH6.0)、250 mM Sucrose (A549 細胞膜小胞) または TS buffer (ABCC4 過剰発現細胞膜小胞) に懸濁し、27 G の針で 25 回通し、液体窒素で急速凍結した。膜小胞の懸濁液は実験まで -80 °C で保存し、使用時は氷上で融解した。

膜小胞を用いた PG 輸送実験

輸送実験は迅速濾過法により行った。Reaction mixture は 50 mM HEPES-Tris (pH7.4) もしくは MES-Tris (pH6.0)、250 mM Sucrose (A549 細胞膜小胞) または 4 mM ATP or AMP, 10 mM MgCl₂, 10 mM creatine phosphate, 100 µg/mL creatine kinase を含む TS buffer (ABCC4 過剰発現細胞膜小胞) に膜小胞 (25 µg) を加えて 50 µL とし、37 °C で既定時間インキュベ-

トした。Reaction mixture に氷冷した TS buffer 1 mL を加え、glass microfiber filters (GF/F, 0.7 μ m, 25 mm; GE Healthcare) または cellulose acetate membrane filter (OE67, 0.45 μ m, 25 mm; GE Healthcare) に通して反応を停止させた。フィルターを 3 mL の氷冷した TS buffer で洗浄後、10 ng/mL の重水素標識 PG のメタノール溶液 5 μ L をフィルターに添加した。その後 PG フィルターに保持された PG を 1 mL tert-ブチルメチルエーテルを加えて回収した。回収した tert-ブチルメチルエーテル溶液は窒素気流下溶媒留去後 50 μ L の移動相に再溶解し、10 μ L を分析に付した。分析カラムには SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MG II (5 μ m, 2.0 \times 150 mm) を使用し、移動層には水/アセトニトリル/酢酸=55/45/0.1 (v/v/v) の混液を流速 0.2 mL/min で用いた。さらにイオン化促進のため、10 mM グリセリンを溶かしたメタノールを 0.2 mL/min でポストカラム添加した。

PG 放出実験

A549 細胞及び TE671 細胞は、 2×10^5 cells/well で 6 well plate (Costar)、または 4×10^5 cells/well で 60 mm dish (Corning) に播種し、3-4 日後に DMEM (FBS free) に交換し、24 時間 CO₂ インキュベーター内に静置した。その後、37 °C の水浴上で DMEM (FBS free、 \pm 10 μ M A23187) に交換し、5 分後に上清を回収した。その後細胞を氷冷した PBS (10 μ M インドメタシン含有) で 3 回洗浄し、セルスクレーパーにより掻き取った後、1,500 \times g、5 分、4 °C で遠心しペレットを回収した。

HMC-1 細胞は 75 cm² 細胞培養用フラスコに 20×10^4 cells/mL で 15 mL 播種し、3 日後に培地交換しさらに 2 日後に 50 μ M AA または 50 μ M EPA を含む培養液 (FBS 含有) に交換した。24 時間後に細胞を 500 \times g、5 分の遠心で回収し、37 °C に温めた PBS に再懸濁した。PBS に懸濁した細胞は 500 - 1000 $\times 10^4$ cells/tube になるように 1.5 mL チューブに分注し、

500 × g、5 分で遠心した。上清を吸引除去後、IMDM (± 10 μM CeefourinTM 1) 200 μL を添加して 37°C 水浴上に静置し、5 分後に氷冷した PBS (10 μM インドメタシン含有) 800 μL を加えた。その後 1500 × g、5 分、4 °C で遠心し、上清約 800 μL を回収した。細胞ペレットはさらに氷冷した PBS (10 μM インドメタシン含有) 1 mL に再懸濁して洗浄し、1500 × g、5 分、4 °C で遠心し上清を吸引除去した。

RBL-2H3 細胞は 24 well plate に 2.5×10^5 cells/well で播種し、10% FBS EMEM (10 μL/mL 抗 DNP-IgE ハイブリドーマ培養上清) 培地で 24 時間培養した。その後 37 °C の水浴上で培地を吸引除去し、1 × PIPES buffer (2 mM CaCl₂, 0.1% BSA) にて 2 回洗浄した後、0.5 mL 1 × PIPES buffer (± 50 ng/mL DNP-HSA、± 10 μM CeefourinTM 1) を添加した。5 分後に回収した薬液を 600 × g、3 分、4 °C で遠心し上清を回収した。細胞は氷冷した PBS (10 μM インドメタシン含有) で 3 回洗浄し、セルスクレーパーにより掻き取った後、1,500 × g、5 分、4 °C で遠心しペレットを回収した。

いずれの実験でも得られた上清及び細胞ペレットは、前処理まで -80 °C で保存した。

A549 細胞、HMC-1 細胞への ABCC4 siRNA の導入

siRNA は ABCC4 siRNA (Oligo ID: HSS115675, HSS173510) 及び Negative Control Low GC Duplex (Invitrogen) を使用した。A549 細胞への siRNA の導入は、LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen) を用いたリポフェクション法により行った。Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium 800 μL に各 ABCC4 siRNA 及び LipofectamineTM RNAiMAX を 4 μL 加え、10-20 分間室温で静置し、60 mm dish に加えた。Penicillin-streptomycin を含まない DMEM に懸濁させた A549 細胞 1.0×10^5 cells/mL 液を調製後、60 mm dish に 4 mL/well 播種し培養を行い、siRNA 導入 72 時間後に実験に使用した。なお、各 siRNA の終濃度は 1 nM とした。HMC-1

細胞への siRNA の導入は、Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) を用いたリポフェクション法により行った。Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 4.8 mL に各 ABCC4 siRNA 80 μ L 及び Lipofectamine™ 3000 190 μ L を加え、10 分間室温で静置した後、1.5 mL ずつ 3 つの 75 cm² 細胞培養用フラスコ (75 \times 10⁴ cells/mL HMC-1 cells \times 15 mL) に添加した。なお、各 siRNA の終濃度は 30 nM とした。

測定サンプルの前処理

回収した上清 (0.5 mL) は 10 % BHT (in ethanol) 5 μ L、IS 溶液 (5 ng/mL each PG-d4 mixture in methanol) 5 μ L を添加し、細胞外サンプルとした。回収した細胞は 10 % BHT in ethanol 5 μ L、IS 溶液 5 μ L を添加した後、氷冷したリン酸緩衝液 (0.1 M Sodium phosphate、1 mM EDTA、10 μ M indomethacin、pH7.4) 0.5 mL に懸濁し、15 分、4 °C で超音波処理した。その後、15,000 \times g、15 分、4 °C で遠心し、得られた上清を回収し細胞内サンプルとした。

測定サンプルの精製は Bond Elut® C18 (Agilent Technologies) を用いた固相抽出により行った。メタノール 1 mL 及び水 1 mL でプレコンディショニングした後、1 N HCl で pH 3 にしたサンプルをアプライし、水 1 mL 及び水/メタノール (50:50, v/v) 1 mL でカートリッジを洗浄後、メタノール 1 mL で PG を溶出した。溶出したメタノール溶液を窒素気流下溶媒留去し、50 μ L の移動相に再溶解し、10 μ L を分析に付した。分析カラムには SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MG II (3 μ m、2.0 \times 150 mm) を使用し、移動層には水/アセトニトリル/酢酸=60/40/0.1 (v/v/v) の混液を流速 0.2 mL/min で用いた。さらにイオン化促進のため、10 mM グリセリンを溶かしたメタノールを 0.2 mL/min でポストカラム添加した。

Western blotting

測定サンプルの前処理 で得られたペレット (A549 細胞)、60 mm dish にコンフルエントになるまで培養した TE671 細胞または 25 cm² フラスコに培養した HMC-1 細胞 (100 × 10⁴ cells/mL × 5 mL) を 1500 × g、5 分遠心分離し得られたペレットを Lysis buffer (1 % Triton-X, 0.1 % sodium dodecylsulfate (SDS), 4.5 M urea in PBS) に懸濁し、5 分間氷上に静置した。その後、15 分、4 °C で超音波処理し、14,000 × g、15 分、4 °C で遠心後、得られた上清をサンプルとした。タンパク質の定量には、Pierce® BCA Protein Assay Kit を使用した。

タンパク抽出液を 4 倍量 (v/v) の Urea 溶液 (9M Urea in PBS) 及び 5 倍量 (v/v) の 2 × SDS sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 10 % 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerol, 0.004 % Bromophenolblue) と混合し、100 °C、3 分で加熱変性した。Stacking gel (4.5 % Polyacrylamide, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 % SDS, 0.1 % Ammonium persulfate (APS), 0.01 % N, N, N', N',-Tetramethylethylenediamine (TEMED)) 及び Running gel (10 % Polyacrylamide, 250 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.01 % TEMED) を用い、200V、500 mA で電気泳動した。その後、ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロースメンブレン (BIO-RAD) へタンパク質の転写を行った。転写は Transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20 % Methanol, 0.02 % SDS) に浸したろ紙にポリアクリルアミドゲル及びニトロセルロースメンブレンをはさみ、100 V、350 mA で行った。転写後、メンブレンを Ponceau-S 溶液 (0.1 % Ponceau-S (w/v)、5.0% acetic acid (w/v)) に 5 分間振とうし、ChemiDoc™ MP (Bio-Rad) で撮影した。その後メンブレンを Blocking buffer (0.05 % Tween 20, 5 % Skim milk in PBS) 中で 1 時間振とうした。一次抗体 (rat anti-MRP4 monoclonal antibody (Clone M4I-10, Abcam)) を Diluent buffer (0.05 % Tween 20, 0.025 % Skim milk in PBS) に抗体価に応じて希釈し、メンブレンとともにシーリングし、4 °C で一晩振とうした。その後、メンブレンを Wash buffer

(0.05 % Tween 20 in PBS) で 5 分、3 回洗浄し、Diluent buffer で抗体価に応じて希釈した HRP 標識二次抗体液をメンブレンとシーリングし、室温で 1 時間振とうした。メンブレンを Wash buffer で 5 分、3 回洗浄し、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を反応させ、ChemiDoc™ MP で撮影した。画像解析は Image Lab™ ソフトウェア (Bio-Rad) により行った。

RT-PCR 及び定量的 PCR

Total RNA の抽出は TriPure Isolation Reagent (Sigma Aldrich) を用いて行った。回収した細胞 (100×10^4 cells) を TriPure Isolation Reagent 200 μ L に溶解させ、5 分間室温で静置した後、クロロホルム 40 μ L を加えて激しく転倒混和し、10 分間室温で静置後、 $12,000 \times g$ 、15 分、4 °C で遠心分離した。上清約 100 μ L に 2-プロパノール 100 μ L を加えて数回転倒混和し、5 分室温で静置後、 $12,000 \times g$ 、10 分、4 °C で遠心分離した。沈殿に 75%エタノール 200 μ L を加えてボルテックスし、 $7,500 \times g$ 、5 分、4 °C で遠心分離を行い、風乾後 total RNA を TE buffer に溶解させた。Total RNA の 260 nm における O.D. 値をナノドロップ (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, U.S.A) により測定し、total RNA の濃度を算出した。

逆転写反応は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて行った。0.5 μ g/6 μ L となるように total RNA を希釈後、2 μ L 4 \times DN Master Mix を加え、37 °C で 5 分静置し DNase 処理を行った。続いて 2 μ L 5 \times RT Master Mix II を加え、Chart 1 の条件で反応させた。

RT-PCR は TaKaRa Taq™ (タカラバイオ) を用いて行った。Table 3 のように調製した反応液を Chart 2 の条件で反応させた。また、用いた primer の塩基配列を Table 4 に示した。反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Touch (タカラバイオ) を用いた。増幅産物は 1.5% アガロース

ゲル(0.5 µg/mL EtBr 含有)により TAE buffer 中で 100 V、30 分電気泳動し、ChemiDoc™ MP で撮影した。画像解析は Image Lab™ ソフトウェアにより行った。

定量的 PCR は THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)を用いて行った。Table 5 のように調製した反応液を Chart 3 の条件で反応させた。反応および検出には StepOnePlus™リアルタイム PCR システム (ThermoFisher Scientific) を使用した。また、用いた primer の塩基配列を Table 6 に示した。

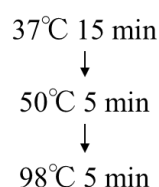


Chart 1 Procedure for reverse transcription

Table 3 Composition of reaction solution for RT-PCR

Component	Volume/Reaction
10 × buffer	2 µL
dNTP mix (2.5 mM each)	1.6 µL
Primer mix (20 pmol/µL each)	0.25 µL
Nuclease free water	Variable
Tempalte DNA (2.5 ng/µL)	Variable
Total volume	20 µL

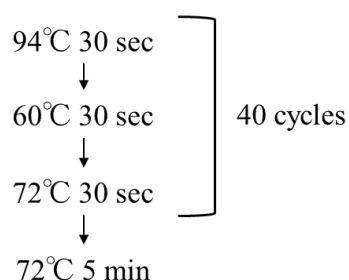


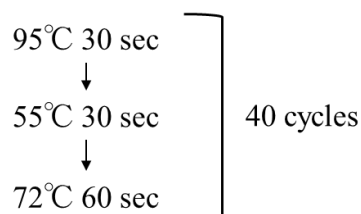
Chart 2 Procedure for RT-PCR

Table 4 Sequences of primers for RT-PCR

Name		Sequence	Product size (bp)
rGAPDH	Forward	5' - AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3'	248
	Reverse	5' - GATGGTGATGGGTTTCCCGT-3'	
rABCC4	Forward	5'-TTCTTCTGGTGGCTCAACCC-3'	344
	Reverse	5'-TAGCCGTAAGCTGTGTGCAA-3'	

Table 5 Composition of reaction solution for qRT-PCR

Component	Volume/Reaction
qPCR Master Mix (2×)	5 µL
Rox Reference Dye Low (50×)	0.2 µL
Primer mix (20 pmol/µL each)	0.125 µL
RNase free water	Variable
Tempalte DNA (50 ng/µL)	Variable
Total volume	10 µL

**Chart 3 Procedure for qRT-PCR****Table 6 Sequences of primers for qRT-PCR**

Name	Sequence	Product size (bp)
hABCC4	Forward : 5'-GCTCAGGTTGCCTATGTGCT-3'	100
	Reverse : 5'-CGGTTACATTTCCCTCCTCCA-3'	
hGAPDH	Forward : 5'-AAGGTCATCCCTGAGCTGAA-3	96
	Reverse : 5'-TTCTAGACGGCAGGTCAGGT-3	
hHPRT	Forward : 5'-GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3	71
	Reverse : 5'-TCCTTTTCACCAGCAAGCTTG-3	

統計解析

非線形回帰分析は KaleidaGraph (version 12.5) を用いて行った。

速度論的パラメーターは、全て以下の式を用いて算出した。

$$V = (V_{\max} \times S) / (K_m + S)$$

V (pmol/mg protein/30 sec) は取り込み速度、 V_{\max} (pmol/mg protein/30 sec) は最大取り込み速度、 S (μM) は基質濃度、 K_m (μM) は Michaelis 定数を表す。

有意差の検定は、JMP® Pro (version 12.0.1) を用い、Student's t-test (二群間の比較) または ANOVA に続く Dunnett's test (多群比較) によって行った。

第3章 付属実験

PG 放出実験

A549 細胞は 2×10^5 cells/well で 6 well plate (Costar) に播種し、3-4 日後に DMEM (FBS free) に交換し、24 時間 CO₂ インキュベーター内に静置した。その後、37 °C の水浴上で緩衝液 (125 mM NaCl、4.8 mM KCl、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、1.2 mM CaCl₂、5.6 mM D-glucose、25 mM HEPES (pH7.4) or MES (pH5.5)) に交換し、5 分後に上清を回収した。その後細胞を氷冷した PBS (10 μM Indomethacin 含有) で 3 回洗浄し、セルスクレーパーにより掻き取った後、 $1,500 \times g$, 5 分, 4 °C で遠心しペレットを回収した。得られた上清及び細胞ペレットは、前処理まで -80 °C で保存した。

細胞内 pH 測定 ¹²⁶

A549 細胞を BioCoat コラーゲン I マルチウェルプレート 96 ウェル (黒色ウェル/透明ボ

トム) (Corning) に 2×10^4 cells/well で播種し、4 日間 CO₂ インキュベーター内に静置した。その後、DMEM (FBS 不含) に交換し 24 時間 CO₂ インキュベーター内に静置した。DMEM を吸引除去後、1 μ M BCECF-AM を含む DMEM を 100 μ L/well で添加し、10 分間 CO₂ インキュベーター内に静置した後、DMEM を吸引除去し pH7.4 の緩衝液 (125 mM NaCl、4.8 mM KCl、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、1.2 mM CaCl₂、5.6 mM D-glucose、25 mM HEPES (pH7.4)) 200 μ L で 2 回洗浄した。その後、緩衝液 (125 mM NaCl、4.8 mM KCl、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、1.2 mM CaCl₂、5.6 mM D-glucose、25 mM HEPES (pH7.4) or MES (pH5.5)) 100 μ L を添加し 5 分後の蛍光強度を測定した。蛍光測定は 2 点測定法を実施し、励起波長 500 nm/蛍光波長 530 nm 及び励起波長 440 nm/蛍光波長 530 nm を測定し、励起波長 500 nm の蛍光強度を励起波長 440 nm の蛍光強度で補正することにより細胞内 pH を求めた。

引用文献

1. Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. (2001) **294**, 1871-1875.
2. Dennis, E. A., and Norris, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. (2015) **15** 511-523.
3. Kalinski, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂. *Journal of Immunology*. (2012) **188**, 21-28.
4. Moreno, J. J. Eicosanoid receptors: Targets for the treatment of disrupted intestinal epithelial homeostasis. *European Journal of Pharmacology*. (2017) **796**, 7-19.
5. Yuhki, K., Kojima, F., Kashiwagi, H., Kawabe, J., Fujino, T., Narumiya, S., and Ushikubi, F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacology and Therapeutics*. (2011) **129**, 195-205.
6. Urade, Y., and Hayaishi, O. Prostaglandin D₂ and sleep/wake regulation. *Sleep Medicine Reviews*. (2011) **15**, 411-418.
7. Narumiya, S. Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*. (2007) **83**, 296-318.

8. Morita, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. (2002) **68-69**, 165-175.

9. Loftin, C. D., Tiano, H. F., and Langenbach, R. Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. (2002) **68-69**, 177-185.

10. Korotkova, M., and Jakobsson, P. J. Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*. (2014) **10**, 229-41.

11. Foudi, N., Gomez, I., Benyahia, C., Longrois, D., and Norel, X. Prostaglandin E₂ receptor subtypes in human blood and vascular cells. *European Journal of Pharmacology*. (2012) **695**, 1-6.

12. Kostenis, E., and Ulven, T. Emerging roles of DP and CRTH2 in allergic inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. (2006) **12**, 148-158.

13. Pettipher, R., Hansel, T. T., and Armer, R. Antagonism of the prostaglandin D₂ receptors DP₁ and CRTH2 as an approach to treat allergic diseases. *Nature Reveiws Drug Discovery*. (2007) **6**, 313-325.

14. Cudaback, E., Jorstad, N. L., Yang, Y., Montine, T. J., and Keene, C. D. Therapeutic implications of the prostaglandin pathway in Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*. (2014) **88**, 565-

572.

15. Wang, D., and Dubois, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer*. (2010) **10**, 181-193.
16. Ricciotti, E., and FitzGerald, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (2011) **31**, 986-1000.
17. Aoki, T., and Narumiya, S. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. (2012) **33**, 304-311.
18. Jones, R. L., Giembycz, M. A., and Woodward, D. F. Prostanoid receptor antagonists: development strategies and therapeutic applications. *British Journal of Pharmacology*. (2009) **158**, 104-145.
19. 丸山隆幸. エイコサノイド受容体を標的とした創薬展開. *実験医学増刊*. (2015) **33**, 192-198.
20. Samuelsson, B., Morgenstern, R., and Jakobsson, P. J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacological Reviews*. (2007) **59**, 207-224.
21. Koeberle, A., and Werz, O. Perspective of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders. *Biochemical Pharmacology*. (2015) **98**, 1-15.
22. Bito, L. Z., and Baroody, R. A. Impermeability of rabbit erythrocytes to prostaglandins. *American Journal of Physiology*. (1975) **229**, 1580-1584.

23. Garcia-Perez, A., and Smith, W. L. Apical-Basolateral Membrane Asymmetry in Canine Cortical Collecting Tubule Cells Bradykinin, Arginine Vasopressin, Prostaglandin E₂ Interrelationships. *Journal of Clinical Investigation*. (1984) **74**, 63-74.
24. Bito, L. Z. Saturable, energy-dependent, transmembrane transport of prostaglandins against concentration gradients. *Nature*. (1975) **256**, 134-136.
25. Moore, S. A., Spector, A. A., and Hart, M. N. Eicosanoid metabolism in cerebromicrovascular endothelium. *American Journal of Physiology*. (1988) **254**, C37-44.
26. Kanai, N., Lu, R., Satriano, J. A., Bao, Y., Wolkoff, A. W., and Schuster, V. L. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science*. (1995) **268**, 866-869.
27. Nomura, T., Lu, R., Pucci, M. L., and Schuster, V. L. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Molecular Pharmacology*. (2004) **65**, 973–978.
28. Schuster, V. L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annual Review of Physiology*. (1998) **60**, 221-242.
29. Yoshioka, M., Sagara, H., Takahashi, F., Harada, N., Nishio, K., Mori, A., Ushio, H., Shimizu, K., Okada, T., Ota, M., Ito, Y. M., Nagashima, O., Atsuta, R., Suzuki, T., Fukuda, T., Fukuchi, Y., and Takahashi K. Role of multidrug resistance-associated protein 1 in the pathogenesis of allergic

- airway inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. (2009) **296**, L30-L36.
30. Mueller, C. F., Wassmann, K., Widder, J. D., Wassmann, S., Chen, C. H., Keuler, B., Kudin, A., Kunz, W. S., and Nickenig, G. Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C₄ export. *Circulation*. (2008) **117**, 2912-2918.
 31. Kawahara, A., Nishi, T., Hisano, Y., Fukui, H., Yamaguchi, A. and Mochizuki, N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science*. (2009) **323**, 524-527.
 32. Hisano, Y., Kobayashi, N., Yamaguchi, A. and Nishi, T. Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLOS ONE*. (2012) **7**, e38941.
 33. Mendoza, A., Bréart, B., Ramos-Perez, W. D., Pitt, L. A., Gobert, M., Sunkara, M., Lafaille, J. J., Morris, A. J. and Schwab, S. R. The transporter Spns2 is required for secretion of lymph but not plasma sphingosine-1-phosphate. *Cell Reports*. (2012) **2**, 1104-1110.
 34. Mendoza, A., Fang, V., Chen, C., Serasinghe, M., Verma, A., Muller, J., Chaluvadi, V. S., Dustin, M. L., Hla, T., Elemento, O., Chipuk, J. E. and Schwab, S. R. Lymphatic endothelial S1P promotes mitochondrial function and survival in naive T cells. *Nature*. (2017) **546**, 158-161.
 35. Vu, T. M., Ishizu, A. N., Foo, J. C., Toh, X. R., Zhang, F., Whee, D. M., Torta, F., Cazenave-

- Gassiot, A., Matsumura, T., Kim, S., Toh, S. E. S., Suda, T., Silver, D. L., Wenk, M. R. and Nguyen, L. N. Mfsd2b is essential for the sphingosine-1-phosphate export in erythrocytes and platelets. *Nature*. (2017) **550**, 524-528.
36. Anwar, A., Anwar, I. J. and Delafontaine, P. Elevation of cardiovascular risk by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Trends in Cardiovascular Medicine*. (2015) **25**, 726-735.
37. Patrono, C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology*. (2016) **82**, 957-64.
38. Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2003) **100**, 9244-9249.
39. Rius, M., Thon, W. F., Keppler, D., and Nies, A. T. Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract. *Journal of Urology*. (2005) **174**, 2409-2414.
40. Lin, Z. P., Zhu, Y. L., Johnson, D. R., Rice, K. P., Nottoli, T., Hains, B. C., McGrath, J., Waxman, S. G., and Sartorelli, A. C. Disruption of cAMP and prostaglandin E₂ transport by multidrug resistance protein 4 deficiency alters cAMP-mediated signaling and nociceptive response.

- Molecular Pharmacology*. (2008) **73**, 243-251.
41. Furugen, A., Yamaguchi, H., Tanaka, N., Shiida, N., Ogura, J., Kobayashi, M., and Iseki, K. Contribution of multidrug resistance-associated proteins (MRPs) to the release of prostanoids from A549 cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. (2013) **106**, 37-44.
42. Smith, W. L. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Current Opinion in Cell Biology*. (2005) **17**, 174–182.
43. Wada, M., DeLong, C. J., Hong, Y. H., Rieke, C. J., Song, I., Sidhu, R. S., Yuan, C., Warnock, M., Schmaier, A. H., Yokoyama, C., Smyth, E. M., Wilson, S. J., FitzGerald, G. A., Garavito, R. M., Sui, de X., Regan, J. W., and Smith, W. L. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *The Journal of Biological Chemistry*. (2007) **282**, 22254-22266.
44. Yang, P., Jiang, Y., and Fischer, S. M. Prostaglandin E₃ metabolism and cancer. *Cancer Letters*. (2014) **348**, 1-11.
45. Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J. A., and Reddy, S. T. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2003) **100**, 1751-1756.

46. Yang, P., Chan, D., Felix, E., Cartwright, C., Menter, D. G., Madden, T., Klein, R. D., Fischer, S. M., and Newman, R. A., Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E₃ from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells. *The Journal of Lipid Research*. (2004) **45**, 1030-1039.
47. Krämer, H. J., Stevens, J., and Seeger, W. Analysis of 2- and 3-series prostanoids by post-HPLC ELISA. *Analytical Biochemistry*. (1993) **214**, 535-543.
48. Yang, P., Felix, E., Madden, T., Fischer, S. M., and Newman, R. A. Quantitative high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 2- and 3-series prostaglandins in cultured tumor cells. *Analytical Biochemistry*. (2002) **308**, 168-177.
49. Furugen, A., Yamaguchi, H., Tanaka, N., Ito, H., Miyamori, K., Fujikawa, A., Takahashi, N., Ogura, J., Kobayashi, M., Yamada, T., Mano, N., and Iseki, K. Quantification of intracellular and extracellular prostanoids stimulated by A23187 by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. (2011) **879**, 3378-3385.
50. Martin-Venegas, R., J'auregui, O., and Moreno, J. J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of eicosanoids and related compounds in cell models. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. (2014) **964**, 41-

- 49.
51. Tsikas, D., and Zoerner, A. A. Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: A historicalretrospect and a discussion. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. (2014) **964**, 79-88.
52. Wang, Y., Armando, A. M., Quehenberger, O., Yan, C., and Dennis, E. A. Comprehensive ultra-performance liquid chromatographic separationand mass spectrometric analysis of eicosanoid metabolites in humansamples. *Journal of Chromatography A*. (2014) **1359**, 60-69.
53. Sterz, K., Scherer, G., and Ecker, J. A simple and robust UPLC-SRM/MS method to quantify urinary eicosanoids. *The Journal of Lipid Research*. (2012) **53**, 1026-1036.
54. Sasaki, A., Fukuda, H., Shiida, N., Tanaka, N., Furugen, A., Ogura, J., Shuto, S., Mano, N., and Yamaguchi, H. Determination of ω -6 and ω -3 PUFA metabolites in human urine samples using UPLC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2015) **407**, 1625-1639.
55. John, H., and Schlegel, W. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of the 11-hydroxythromboxane B₂ anomers equilibrium. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. (1997) **698**, 9-15.
56. Dahl, S. R., Kleiveland, C. R., Kassem, M., Lea, T., Lundanes, E., and Greibrokk, T. Determination of thromboxanes, leukotrienes and lipoxins using high-temperature capillary liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry and on-line sample preparation. *Journal of Chromatography A*. (2009) **1216**, 4648-4654.
57. Russel, F. G., Koenderink, J. B., and Masereeuw, R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends in Pharmacological Sciences*. (2008) **29**, 200-207.
58. van Aubel, R. A., Smeets, P. H., van den Heuvel, J. J., and Russel, F. G. Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. (2005) **288**, F327-F333.
59. Harlfinger, S., Fork, C., Lazar, A., Schömig, E., and Gründemann, D. Are organic cation transporters capable of transporting prostaglandins? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. (2005) **372**, 125-130.
60. Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., de Haas, M., van Deemter, L., Wijnholds, J., Balzarini, J., and Borst, P. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Molecular Pharmacology*. (2003) **63**, 1094-1103.
61. Fujimori, K., Aritake, K., and Urade, Y. Enhancement of prostaglandin D₂ production through cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase by upstream stimulatory factor 1

- in human brain-derived TE671 cells under serum starvation. *Gene*. (2008) **426**, 72-80.
62. Butterfield, J. H., Weiler, D., Dewald, G., and Gleich, G. J. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia Research*. (1988) **12**, 345-355.
63. Macchia, L., Hamberg, M., Kumlin, M., Butterfield, J. H., and Haeggström, J. Z. Arachidonic acid metabolism in the human mast cell line HMC-1: 5-lipoxygenase gene expression and biosynthesis of thromboxane. *Biochimica et Biophysica Acta*. (1995) **1257**, 58-74.
64. Csandl, M. A., Conseil, G., and Cole, S. P. Cysteinyl Leukotriene Receptor 1/2 Antagonists Nonselectively Modulate Organic Anion Transport by Multidrug Resistance Proteins (MRP1-4). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. (2016) **44**, 857-866.
65. Leier, I., Hummel-Eisenbeiss, J., Cui, Y., and Keppler, D. ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney International*. (2000) **57**, 1636-1642.
66. Pratt, S., Chen, V., Perry, W. I. 3rd., Starling, J. J., and Dantzig, A. H. Kinetic validation of the use of carboxydichlorofluorescein as a drug surrogate for MRP5-mediated transport. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2006) **27**, 524-532.
67. Karlgren, M., Vildhede, A., Norinder, U., Wisniewski, J., R., Kimoto, E., Lai, Y., Haglund, U., and Artursson, P. Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides

- (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*. **55**, 4740-4763 (2012)
68. Cheung, L., Flemming, C., L., Watt, F., Masada, N., Yu, D. M., Huynh, T., Conseil, G., Tivnan, A., Polinsky, A., Gudkov, A. V., Munoz, M. A., Vishvanath, A., Cooper, D. M., Henderson, M. J., Cole, S. P., Fletcher, J. I., Haber, M., and Norris, M. D. High-throughput screening identifies Ceefourin 1 and Ceefourin 2 as highly selective inhibitors of multidrug resistance protein 4 (MRP4). *Biochemical Pharmacology*. **91**, 97-108 (2014).
69. Nakanishi, T., Takashima, H., Uetoko, Y., Komori, H., and Tamai, I. Experimental Evidence for Resecretion of PGE2 across Rat Alveolar Epithelium by OATP2A1/SLCO2A1-Mediated Transcellular Transport. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **368**, 317-325 (2019).
70. Sassi, Y., Lipskaia, L., Vandecasteele, G., Nikolaev, V. O., Hatem, S. N., Cohen, Aubart, F., Russel, F. G., Mougenot, N., Vrignaud, C., Lechat, P., Lompré, A. M., and Hulot, J. S. Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *The Journal of Clinical Investigation*. (2008) **118**, 2747-2757.
71. Cheepala, S. B., Pitre, A., Fukuda, Y., Takenaka, K., Zhang, Y., Wang, Y., Frase, S., Pestina, T., Gartner, T. K., Jackson, C., and Schuetz, J. D. The ABCC4 membrane transporter modulates

- platelet aggregation. *Blood*. (2015) **126**, 2307-2319.
72. Shimada, H., Nakamura, Y., Nakanishi, T., and Tamai, I. OATP2A1/SLCO2A1-mediated prostaglandin E₂ loading into intracellular acidic compartments of macrophages contributes to exocytotic secretion. *Biochemical Pharmacology*. (2015) **98**, 629-638.
73. Schuster, V. L., Chi, Y., and Lu, R. The Prostaglandin Transporter: Eicosanoid Reuptake, Control of Signaling, and Development of High-Affinity Inhibitors as Drug Candidates. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. (2015) **126**, 248-257.
74. Feng, Y., Yu, S., Lasell, TK., Jadhav, A. P., Macia, E., Chardin, P., Melancon, P., Roth, M., Mitchison, T., and Kirchhausen, T. Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2003) **100**, 6469-6474.
75. Liu, X., Zhang, S., Arora, J. S., Snyder, N. W., Shah, S. J., and Blair, I. A. 11-Oxoeicosatetraenoic acid is a cyclooxygenase-2/15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase-derived antiproliferative eicosanoid. *Chemical Research in Toxicology*. (2011) **24**, 2227-36.
76. Westcott, J. Y., Wenzel, S. E., and Dreskin, S. C. Arachidonate-induced eicosanoid synthesis in RBL-2H3 cells: stimulation with antigen or A23187 induces prolonged activation of 5-lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. (1996) **1303**, 74-81.

77. Mitra, P., Oskeritzian, C. A., Payne, S. G., Beaven, M. A., Milstien, S., and Spiegel, S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2006) **103**, 16394-16399.
78. van Aubel, R. A., Smeets, P. H., Peters, J. G., Bindels, R. J., and Russel, F. G. The *MRP4/ABCC4* gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *Journal of the American Society of Nephrology*. (2002) **13**, 595-603.
79. Johnson, B. M., Zhang, P., Schuetz, J. D., and Brouwer, K. L. Characterization of transport protein expression in multidrug resistance-associated protein (Mrp) 2-deficient rats. *Drug Metabolism and Disposition*. (2006) **34**, 556-562.
80. El-Sheikh, A. A., van den Heuvel, J. J., Krieger, E., Russel, F. G., and Koenderink, J. B. Functional role of arginine 375 in transmembrane helix 6 of multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4). *Molecular Pharmacology*. (2008) **74**, 964-971.
81. Oskeritzian, C. A. Mast cell plasticity and sphingosine-1-phosphate in immunity, inflammation and cancer. *Molecular Immunology*. (2015) **63**, 104-112
82. Murata, T., Aritake, K., Matsumoto, S., Kamauchi, S., Nakagawa, T., Hori, M., Momotani, E., Urade, Y., and Ozaki, H. Prostaglandin D₂ is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung

- carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2011) **108**, 19802-19807.
83. Iwanaga, K., Nakamura, T., Maeda, S., Aritake, K., Hori, M., Urade, Y., Ozaki, H., and Murata, T. Mast cell-derived prostaglandin D₂ inhibits colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Cancer Research*. (2014) **74**, 3011-3019.
84. Urade, Y., and Eguchi, N. Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. (2002) **68-69**, 375-382.
85. Kanekiyo, T., Ban, T., Aritake, K., Huang, Z. L., Qu, W. M., Okazaki, I., Mohri, I., Murayama, S., Ozono, K., Taniike, M., Goto, Y., and Urade, Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase/beta-trace is a major amyloid beta-chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2007) **104**, 6412-6417.
86. Tachikawa, M., Tsuji, K., Yokoyama, R., Higuchi, T., Ozeki, G., Yashiki, A., Akanuma, S., Hayashi, K., Nishiura, A., and Hosoya, K. A clearance system for prostaglandin D₂, a sleep-promoting factor, in cerebrospinal fluid: role of the blood-cerebrospinal barrier transporters. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (2012) **343**, 608-616.
87. Gose, T., Nakanishi, T., Kamo, S., Shimada, H., Otake, K., and Tamai, I. Prostaglandin transporter

- (OATP2A1/SLCO2A1) contributes to local disposition of eicosapentaenoic acid-derived PGE₃. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. (2016) **122**, 10-17.
88. Malkowski, M. G., Thuresson, E. D., Lakkides, K. M., Rieke, C. J., Micielli, R., Smith, W. L., and Garavito, R. M. Structure of eicosapentaenoic and linoleic acids in the cyclooxygenase site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *The Journal of Biological Chemistry*. (2001) **276**, 37547-37555.
 89. Vecchio, A. J., Simmons, D. M., and Malkowski, M. G. Structural basis of fatty acid substrate binding to cyclooxygenase-2. *The Journal of Biological Chemistry*. (2010) **285**, 22152-22163.
 90. Sauna, Z. E., Nandigama, K., and Ambudkar, S. V. Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. *The Journal of Biological Chemistry*. (2004) **279**, 48855-48864.
 91. Johnson, Z. L., and Chen, J. Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell*. (2017) **168**, 1075-1085.
 92. Guillaume-Gentil, O., Grindberg, R. V., Kooger, R., Dorwling-Carter, L., Martinez, V., Ossola, D., Pilhofer, M., Zambelli, T., and Vorholt, J. A. Tunable Single-Cell Extraction for Molecular Analyses. *Cell*. (2016) **166**, 506–516.
 93. Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki,

- M., Ueno, A., Oh, S., and Kudo, I. Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *The Journal of Biological Chemistry*. (2000) **275**, 32783–32792.
94. Watanabe, K. Recent reports about enzymes related to the synthesis of prostaglandin (PG) F₂ (PGF_{2α} and 9α, 11β-PGF₂). *The Journal of Biochemistry*. (2011) **150**, 593–596.
95. Seo, M. J., and Oh, D. K. Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Progress in Lipid Research*. (2017) **66**, 50–68.
96. Nicoll-Griffith, D. A., Gupta, N., Twa, S. P., Williams, H., Trimble, L. A., and Yergey, J. A. Verlukast (MK-0679) conjugation with glutathione by rat liver and kidney cytosols and excretion in the bile. *Drug Metabolism and Disposition*. (1995) **23**, 1085-1093.
97. Qin, K., and Rosenfield, R. L. Characterization of the basal promoter element of the human type 5 17β-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2005) **1728**, 115-25.
98. Fujimori, K., Kanaoka, Y., Sakaguchi, Y., and Urade, Y. Transcriptional activation of the human hematopoietic prostaglandin D synthase gene in megakaryoblastic cells. Roles of the oct-1 element in the 5'-flanking region and the AP-2 element in the untranslated exon 1. *The Journal of Biological Chemistry*. (2000) **275**, 40511-40516.

99. Maeng, H. J., Lee, W. J., Jin, Q. R., Chang, J. E., and Shim, W. S. Upregulation of COX-2 in the lung cancer promotes overexpression of multidrug resistance protein 4 (MRP4) via PGE₂-dependent pathway. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2014) **62**, 189-196.
100. Nishi, T., Kobayashi, N., Hisano, Y., Kawahara, A., and Yamaguchi, A. Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2014) **1841**, 759-765.
101. Kramer, W., Nicol, S. B., Girbig, F., Gutjahr, U., Kowalewski, S., and Fasold, H. Characterization and chemical modification of the Na⁺-dependent bile-acid transport system in brush-border membrane vesicles from rabbit ileum. *Biochimica et Biophysica Acta*. (1992) **1111**, 93-102.
102. Wong, M. H., Oelkers, P., Craddock, A. L., and Dawson, P. A. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *The Journal of Biological Chemistry*. (1994) **269**, 1340-1347.
103. Fisher, A. B., Dodia, C., Chander, A., and Kleinzeller, A. Transport of choline by plasma membrane vesicles from lung-derived epithelial cells. *American Journal of Physiology*. (1992) **263**, C1250-C1257.
104. Kleinzeller, A., Dodia, C., Chander, A., and Fisher, A. B. Na⁺-dependent and Na⁺-

independent systems of choline transport by plasma membrane vesicles of A549 cell line.

American Journal of Physiology. (1994) **267**, C1279-C1287.

105. International Transporter Consortium, Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Ware, J. A., Wright, S. H., Yee, S. W., Zamek-Gliszczynski, M. J., and Zhang, L. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. (2010) **9**, 215-236.
106. Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2000) **273**, 251-260.
107. Adachi, H., Suzuki, T., Abe, M., Asano, N., Mizutamari, H., Tanemoto, M., Nishio, T., Onogawa, T., Toyohara, T., Kasai, S., Satoh, F., Suzuki, M., Tokui, T., Unno, M., Shimosegawa, T., Matsuno, S., Ito, S., and Abe, T. Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. (2003) **285**, F1188-F1197.
108. Kimura, H., Takeda, M., Narikawa, S., Enomoto, A., Ichida, K., and Endou, H. Human

- organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (2002) **301**, 293-298.
109. Seward, D. J., Koh, A. S., Boyer, J. L., and Ballatori, N. Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta. *The Journal of Biological Chemistry*. (2003) **278**, 27473-27482.
110. Sokol, P. P., Holohan, P. D., and Ross, C. R. Electroneutral transport of organic cations in canine renal brush border membrane vesicles (BBMV). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (1985) **233**, 694-699.
111. Murakami, Y., Kohyama, N., Kobayashi, Y., Ohbayashi, M., Ohtani, H., Sawada, Y., and Yamamoto, T. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metabolism and Disposition*. (2005) **33**, 1845-1851.
112. Halestrap, A. P. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. (2013) **34**, 337-349.
113. Lin, R. Y., Vera, J. C., Chaganti, R. S., and Golde, D. W. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *The Journal of Biological Chemistry*. (1998) **273**, 28959–28965.

114. Futagi, Y., Sasaki, S., Kobayashi, M., Narumi, K., Furugen, A., and Iseki, K. The flexible cytoplasmic loop 3 contributes to the substrate affinity of human monocarboxylate transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2017) **1859**, 1790-1795.
115. Schuster, V. L. Prostaglandin transport. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. (2002) **68-69**, 633-647.
116. Takagi, M., Taki, Y., Sakane, T., Nadai, T., Sezaki, H., Oku, N., and Yamashita, S. A new interpretation of salicylic acid transport across the lipid bilayer: implications of pH-dependent but not carrier-mediated absorption from the gastrointestinal tract. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (1998) **285**, 1175-1180.
117. Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Ecker, G. F., Faller, B., Fischer, H., Gerebtzoff, G., Lennernaes, H., and Senner, F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Reviews Drug Discovery*. (2010) **9**, 597-614
118. Di, L., Artursson, P., Avdeef, A., Ecker, G. F., Faller, B., Fischer, H., Houston, J. B., Kansy, M., Kerns, E. H., Krämer, S. D., Lennernäs, H., and Sugano, K. Evidence-based approach to assess passive diffusion and carrier-mediated drug transport. *Drug Discovery Today*. (2012) **17**, 905-912.
119. Casey, J. R., Grinstein, S., and Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. (2010) **11**, 50-61.

120. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. (2011) **144**, 646-674.
121. Liberti, M. V., and Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. (2016) **41**, 211-218.
122. Pavlova, N. N., and Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*. (2016) **23**, 27-47.
123. Hangai, S., Ao, T., Kimura, Y., Matsuki, K., Kawamura, T., Negishi, H., Nishio, J., Kodama, T., Taniguchi, T., and Yanai, H. PGE₂ induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2016) **113**, 3844-3849.
124. Prima, V., Kaliberova, L. N., Kaliberov, S., Curiel, D. T., and Kusmartsev, S. COX2/mPGES1/PGE₂ pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2017) **114**, 1117-1122.
125. Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., and Serrano, F. O. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*. (1995) **103**, 113-122.

126. Ozkan, P., and Mutharasan, R. A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-

AM. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2002) **1572**, 143-148.